

HISTAMINMETHYLTRANSFERASE IN DER MAGEN-
SCHLEIMHAUT DES MENSCHEN UND VERSCHIEDENER
SÄUGETIERE: ANREICHERUNG, EIGENSCHAFTEN,
WIRKUNGSMECHANISMUS UND BEEINFLUSSBARKEIT
DURCH HISTAMIN-REZEPTORANTAGONISTEN

EIN BEITRAG ZUR DISKUSSION DES HISTAMINS
ALS EINEM PHYSIOLOGISCHEN CHEMOSTIMULATOR
DER MAGENSAFTSEKRETION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
HANS BARTH

München 1974

1975

HISTAMINMETHYLTRANSFERASE IN DER MAGEN-
SCHLEIMHAUT DES MENSCHEN UND VERSCHIEDENER
SÄUGETIERE: ANREICHERUNG, EIGENSCHAFTEN,
WIRKUNGSMECHANISMUS UND BEEINFLUSSBARKEIT
DURCH HISTAMIN-REZEPTORANTAGONISTEN

EIN BEITRAG ZUR DISKUSSION DES HISTAMINS
ALS EINEM PHYSIOLOGISCHEN CHEMOSTIMULATOR
DER MAGENSAFTSEKRETION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
HANS BARTH

München 1974



1. Berichterstatter: Prof. E. Werle

2. Berichterstatter: Prof. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Mai 1975

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die großzügige Förderung meiner Arbeit.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Lorenz für zahlreiche Diskussionen und wertvolle Anregungen, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Für Irmí, Jonna und Xenia



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551923_0032

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Bedeutung der Histaminmethyltransferase als Schlüsselenzym für die Wirkung von Histamin auf die Belegzelle	1
1.2. Eigenschaften der Histaminmethyltransferase	4
1.3. Hemmung der Histaminmethyltransferase	7
1.4. Ziel der Arbeit	9
2. Material und Methoden	9
2.1. Material	9
2.1.1. Tier- und Gewebematerial	9
2.1.2. Enzympräparationen	10
2.1.2.1. Rohhomogenate	10
2.1.2.2. Teilreinigung der HMT aus Meerschweinchenhirn	10
2.1.2.3. Anreicherung der HMT aus Schweineantrum-mucosa	11
2.1.2.4. Modifizierung der Anreicherung der HMT aus Schweineantrummucosa	12
2.1.2.5. Dialyse und weitere, nicht regelmäßig angewandte Verfahren zur Enzymreinigung	13
2.1.3. Reagenzien	14
2.1.4. Substrat- und Produktanaloge	16
2.1.5. Hemmstoffe und Pharmaka	16
2.2. Methoden	20
2.2.1. Bestimmung der enzymatischen Aktivität der HMT	20
2.2.1.1. Isotopenmethode	20
2.2.1.2. Fluorometrische Methode	23
2.2.2. Proteinbestimmungsmethoden	27
2.2.3. Analytische und präparative Dünnschichtchromatographie zur Identifizierung und Gewinnung von ^{14}C -1(τ)-Methylhistamin	28
2.2.3.1. Identifizierung des ^{14}C -markierten Produktes der durch HMT katalysierten Reaktion als ^{14}C -1(τ)-Methylhistamin	29
2.2.3.2. Präparative Gewinnung von ^{14}C -1(τ)-Methylhistamin	30
2.2.4. Statistische Auswertungen	31

3.	Ergebnisse	31
3.1.	Methoden zur Bestimmung der Aktivität der HMT	31
3.1.1.	Isotopenmethode mit S-Adenosyl-L- [methyl- ^{14}C] methionin	31
3.1.1.1.	Reaktionskinetik	31
3.1.1.2.	Identifizierung von 1(τ)-Methylhistamin als Reaktionsprodukt der Methylierung	33
3.1.1.3.	Inkubationsbedingungen	34
3.1.1.4.	Extraktionsbedingungen und Zählausbeuten	39
3.1.1.5.	Präzisionskontrolle der Isotopenmethode	41
3.1.2.	Fluorometrische Methode mit Bestimmung von Histamin	41
3.1.2.1.	Reaktionskinetik	41
3.1.2.2.	Spezifische Bestimmung von Histamin als das Substrat der durch die HMT katalysierten Methylierung	42
3.1.2.3.	Inkubationsbedingungen	42
3.1.2.4.	Ausbeute und Präzisionskontrolle der fluorometrischen Methode	44
3.1.3.	Richtigkeit der Proteinbestimmung	45
3.1.4.	Vergleich der Isotopenmethode mit der fluorometrischen Methode zur Bestimmung der HMT-Aktivität	45
3.2.	Vorkommen und Verteilung der HMT in der Magenschleimhaut von Mensch, Hund und Schwein	47
3.3.	Beziehung zwischen der HMT-Aktivität und dem Histamingehalt in der Magenschleimhaut von Mensch, Hund und Schwein	47
3.4.	Anreicherung der HMT aus der Antrumschleimhaut des Schweines	50
3.4.1.	Verfahren zur bisher höchsten Anreicherung der HMT aus Schweineantrumschleimhaut	50
3.4.2.	Auswirkung von Zentrifugation, Dialyse und Lyophilisation auf die Enzymaktivität	52
3.4.3.	Anreicherung der HMT durch Anwendung einiger Grobreinigungsverfahren	53
3.4.4.	Reinigungsverfahren unter Anwendung von Säulenchromatographie	54
3.4.4.1.	Elution mittels eines kontinuierlichen Kochsalzgradienten	54

3.4.4.2.	Elution mittels eines diskontinuierlichen (Stufen)-Kochsalzgradienten	55
3.5.	Eigenschaften der HMT	55
3.5.1.	Physikalisch-chemische Eigenschaften	55
3.5.2.	Enzymatische Eigenschaften	57
3.5.2.1.	Substratspezifität	57
3.5.2.2.	Michaeliskonstanten	58
3.5.3.	Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der HMT	60
3.5.3.1.	Festlegung des Grundtyps des Reaktionsmechanismus durch vier Kriterien	60
3.5.3.2.	Argumente für einen geordneten Sequentialtyp der Reaktion und Formulierung des Reaktionsmechanismus	64
3.5.4.	Hemmstoffe der HMT aus Schweineantrum mucosa	67
3.5.4.1.	Histamin und Histaminanaloge	68
3.5.4.2.	Produkte und Produktanaloge	69
3.5.4.2.1.	Hemmung der HMT durch 1(Σ)-Methylhistamin und andere methylierte Histamine	69
3.5.4.2.2.	Aktivierung der HMT durch methylierte Histamine sowie verschiedene andere Substanzen	70
3.5.4.2.3.	Hemmung und Aktivierung der HMT durch SAH und SAH-Analoge	75
3.5.4.3.	Sulphydryl-Reagenzien	78
3.5.4.4.	Aktivierung der HMT durch SH-Gruppen schützende Substanzen	80
3.5.4.5.	Hemmung der HMT durch Metallionen	82
3.5.4.6.	Hemmung der HMT durch die Antimalariamittel Amodiachin und Chlorochin	82
3.5.4.7.	Hemmung und Aktivierung der HMT durch Histamin-H ₁ - und Histamin-H ₂ -Rezeptorantagonisten	84
3.5.4.7.1.	Hemmung und Aktivierung der HMT durch H ₁ -Rezeptorantagonisten und verschiedene Phenothiazine	84
3.5.4.7.2.	Hemmung und Aktivierung der HMT durch H ₂ -Rezeptorantagonisten und durch 5-Methylburimamid	91

	Seite
4. Diskussion	95
4.1. Stellung der HMT im Histaminstoffwechsel der Magenschleimhaut	95
4.2. Bestimmungsmethode der HMT-Aktivität	96
4.3. Reinigung der HMT aus Schweineantrum mucosa	99
4.4. Vergleich der enzymatischen Eigenschaften der HMT aus Schweinemagenmucosa mit den Ergebnissen der HMT aus anderen Organen	101
4.5. Reaktionsmechanismus der HMT und Bindung von SAM bzw. SAH an das Enzymprotein	103
4.6. Hemmstoffe der HMT	106
4.7. Modell für das "stimulus-secretion-coupling" an der Belegzelle des Magens und für die Rolle von methylierten Histaminen und HMT in diesem System	111
5. Zusammenfassung	114
6. Literaturverzeichnis	116

In dieser Arbeit wurden folgende häufig wiederkehrende und gebräuchliche Abkürzungen benützt:

HMT	Histaminmethyltransferase (S-Adenosyl-methionin: Histamin-N-Methyl- transferase; EC 2.1.1.8)
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SAH	S-Adenosyl-L-homocystein
NaPP	Natriumdihydrogenphosphat / Dinatrium- hydrogenphosphat-Puffer

1. Einleitung

1.1. Bedeutung der Histaminmethyltransferase als Schlüssel- enzym für die Wirkung von Histamin auf die Belegzelle

Für die Verbindung zwischen hormonalen Wirkungen an Drüsenzellen und dem eigentlichen Sekretionsprozeß ("stimulus-secretion coupling") werden verschiedene Konzepte auf molekularbiologischer Ebene diskutiert. Erwiesen ist eine Übertragung dieser Effekte durch cyclisches Adenosin-monophosphat, durch Calciumionen, oder an neuronalen Synapsen über die parasympathische Nervenregung durch Acetylcholin bzw. über Sympathicusstimulierung durch Catecholamine (Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin). Über derartige Funktionen von Prostaglandinen, Peptiden und biogenen Aminen wie Serotonin und Histamin gibt es bis heute noch keine gesicherten Erkenntnisse, sondern allenfalls Hypothesen.

Popielski entdeckte 1920 (121), daß Histamin die Magensaftsekretion sehr wirkungsvoll stimuliert. Seither wurde von zahlreichen Autoren (zur Übersicht s. 93) die Hypothese von Histamin als dem finalen Chemostimulator der Magensaftsekretion favorisiert, gleichsam als Bindeglied zwischen vagaler Acetylcholin-, bzw. antraler und intestinaler Gastrinfreisetzung und Auslösung der Salzsäuresekretion des Magens (s. Tab. 1). Hierzu kamen in den letzten Jahren Hypothesen über eine physiologische Rolle von Histamin bei der Magensaftsekretion, in welchen diesem biogenen Amin die unterschiedlichsten Beeinflussungen verschiedener Kontroll-, Überträger- und Potenzierungsmechanismen zugeschrieben werden (s. Tab.1).

Die These des finalen Chemostimulators wurde indessen in Arbeiten von Grossman (57), Aures et al. (7), Johnson und Grossman (73), Håkanson und Liedberg (64) und Waton (153) weitgehend abgelehnt. In den letzten beiden Jahren stützte aber die Entdeckung der Histamin- H_2 -Rezeptorantagonisten Burimamid und Metiamid (18, 19) wiederum diese These, da die spezifischen H_2 -Rezeptorantagonisten sowohl die durch Histamin und Gastrin als auch die durch Acetylcholin induzierte Magensaftsekretion hemmen konnten.

Dem Histamin zuge dachte Funktion bei der Magensaftsekretion	Lit.
1. Gemeinsamer finaler Chemostimulator der Magensaftsekretion	32 93
2. Regulator metabolischer Prozesse in der Magenschleimhaut	74
3. Generelle Funktion in endokrinen, Polypeptide sezernierenden, Zellen	63
4. Kontrolle der Mikrozirkulation um die Parietalzelle	153
5. Mediator der durch Gastrin stimu- lierten Magensaftsekretion	20
6. Potenzierung der durch Gastrin stimu- lierten Magensaftsekretion	148
7. Effektor am Gastrin- und Acetylcholin- Rezeptor über den Histamin-H ₂ -Rezeptor	58
8. Mediator und/ oder Potentiator der Gastrinfreisetzung im Antrum	100 53

Tab. 1 Übersicht über die vorgeschlagenen Hypothesen einer
möglichen physiologischen Funktion des Histamins in
der Magenschleimhaut

Die vielen widersprüchlichen Befunde und Hypothesen zu diesem Fragenkomplex legten aber nahe, daß die Theorie von Histamin als dem finalen Chemostimulator der Magensaftsekretion die vielfältigen Reaktionen verschiedener Hormone und Nerven an den salzsäurebildenden Belegzellen zu einfach darstellte. Sie sollte durch ein Konzept ersetzt werden, das von einer multivalenten Wirkung von lokalen und humoralen Transmitterstoffen an der Belegzelle ausgeht und deren gegenseitige Beeinflussung an den Belegzellrezeptoren analysiert. Ein wichtiger Ansatzpunkt für dieses Konzept ist die Beobachtung, daß sich fast alle gastrointestinalen Hormone gegenseitig in ihrer Wirkung auf die Magensaftsekretion potenzieren (s.Tab. 2).

Spezies	Grundstimulation	Steigerung durch:	Lit.
Ratte	Gastrin	Aminoguanidin Iproniazid	3
	Histamin	Chlorpromazin Bromlysergsäure- diäthylamid	4
Katze	Histamin	Pentagastrin Betanechol Gastrin I	48
Hund	Ligatur der Vena portae	Histamin Fütterung	56
	Histamin	Gastrin Betanechol	73
Mensch	Pentagastrin	Distension	39
	Pentagastrin	Histamin	82

Tab. 2 Eine Auswahl der wichtigsten Beispiele für potenzierende Mechanismen von gastrointestinalen Hormonen am Magen

Von Potenzierung darf in diesem Zusammenhang nur gesprochen werden, wenn durch den zweiten Agonisten $c_{\max}$ (= maximum capacity (112) entsprechend $v_{\max}$ in der Enzymkinetik) des ersten Agonisten erhöht wird (Ableitung üblicherweise nach Eadie-Hofstee (71)).

Die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Hormone und Transmitter hängt stark von der Konzentration des einzelnen Stoffes in Rezeptornähe ab. Sie wird durch enzymatische Aktivitäten und Speicherungs- sowie Freisetzungsmechanismen kontrolliert. Das Enzym, das sehr wahrscheinlich in entscheidender Weise die lokale Konzentration des Histamins reguliert, ist die spezifisch Histamin umsetzende Histaminmethyltransferase (HMT), die - ähnlich wie die Acetylcholinesterase die freie Acetylcholinmenge - die Histaminmenge kontrolliert. Diese Hypothese ergibt sich vor allem aus dem Befund, daß im Magen praktisch keine oxydative Desaminierung des Histamins

vorkommt (91, 92, 83, 109), welche bis heute den zweiten entscheidenden Stoffwechselweg der Histamininaktivierung darstellt (126). Die HMT der Magenschleimhaut wurde deshalb im folgenden untersucht.

1.2. Eigenschaften der Histaminmethyltransferase

Die HMT setzt S-Adenosyl-L-methionin (SAM) und Histamin (4-(β -Aminoäthyl)-imidazol) zu S-Adenosyl-L-homocystein (SAH) und 1(τ)-Methylhistamin (1-Methyl-4-(β -aminoäthyl)-imidazol) um (Abb. 1). Allgemein werden bei Transmethylierungsreaktionen die Methylgruppen als Einheit übertragen (51). Der Transfer erfolgt in Form einer nucleophilen Substitution am Akzeptor-substrat (133, 115, 118). Der stark exergone Übergang von SAM zu SAH macht es wahrscheinlich, daß Transmethylierungsreaktionen irreversibel verlaufen (130).

Die HMT benötigt als Donorsubstrat für die Methylierung des Histamins die aktivierte Methylgruppe des SAM. Zappia et al. (160) fanden eine um eine Zehnerpotenz geringere Methylierung des Histamins, wenn bei angereichertem Enzym aus Meerschweinchenhirn anstelle von SAM S-Inosyl-L-Methionin als Methyl-donor verwendet wurde. Derivate des SAM und des S-Inosyl-L-Methionins, die im Aminosäurerest oder in der Purinbase verändert waren, sowie S-Methyl-L-methionin konnten ebensowenig als Methylgruppendonoren dienen (160) wie Betain, Methionin und Methioninsulfoxyd (87).

Die Akzeptorsubstratspezifität der HMT wurde bei den Enzymen aus Meerschweinchenhirn (25, 145), Schweineleber (87, 60) und Katzendarm (145) geprüft. Von allen untersuchten Verbindungen (Imidazole, Pyrazole, Triazole, Thiazole, Pyrazine, Pyridazine, Pyridine etc.) wurden nur Histamin sowie im Falle des Enzyms aus Schweineleber nur Histamin und N',N'-Dimethylhistamin (4-(β -Dimethylaminoäthyl)-imidazol)

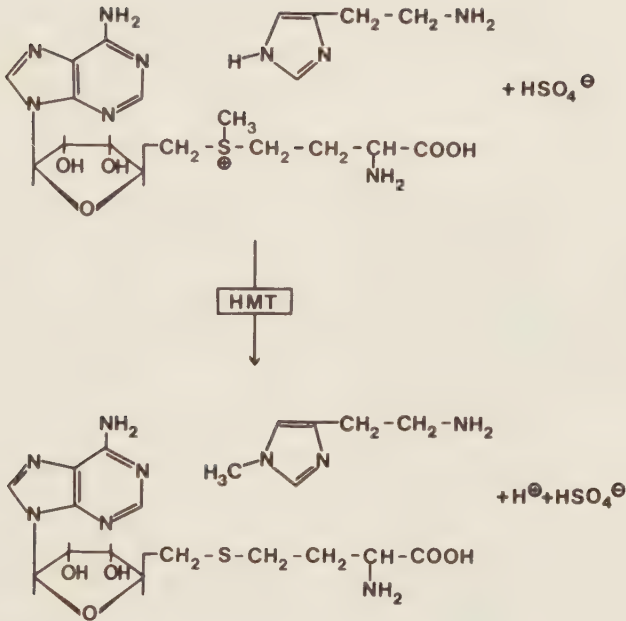


Abb. 1 Reaktionsschema der durch HMT katalysierten Transmethylierung

methyliert. N,N'-Dimethylhistamin war aber ein schlechteres Substrat als Histamin, wobei die Methylierungsgeschwindigkeit nur etwa 30% von der des Histamins unter denselben Inkubationsbedingungen (optimal für Histamin) betrug (60).

Bisher bekannte K_m-Werte für die HMT bezüglich Histamin und SAM als Substrat und die pH-Optima sind in Tab. 3 zusammengestellt. Aus der Leber des Hundes und des Menschen konnten Axelrod und Vessell (9) durch Stärkegelelektrophorese zwei Enzymfraktionen trennen, die verschiedene Michaeliskonstanten zeigten.

Spezies	Organ	$K_m(\text{Histamin})$ $\times 10^{-5} \text{ M}$	$K_m(\text{SAM})$ $\times 10^{-5} \text{ M}$	pH-Optimum	Lit.
Meer- schwein- chen	Hirn	3,5	38	7,2-7,4	25
		4,3	0,97	-	143
		4,1	2,1	8,4	145
		3,7	0,94	-	139
		0,8	0,6	-	15
Maus	Hirn	0,6-0,9	3,0	-	140
Ratte	Niere	2,33	-	-	117
Kaninchen	Darm	1,2	0,87	8,8	139
Katze	Leber	8,1	-	-	9
	Niere	3,8	1,2	-	146
		2,6	1,3	8,2	139
	Darm	3,6	2,6	8,0-8,2	145
		2,7	1,1	-	139
Hund	Leber	1,0 u. 2,4	-	-	9
Schwein	Magen	2,3	-	7,4	100
	Leber	10,0	-	7,0-10,0	87
		2,2	1,6	8,8	60
Mensch	Leber	95 u. 2,0	-	-	9

Tab. 3 Zusammenstellung von bisher bekannten K_m -Werten und pH-Optima von HMT aus verschiedenen Geweben

Bis heute ist nicht bekannt, ob die HMT für ihre volle Aktivität einen Cofaktor benötigt. So steigern z.B. 2-wertige Metalle wie Magnesium, das ein Cofaktor der Catecholmethyltransferase (EC 2.1.1.6) ist (8), die Umsatzgeschwindigkeit von Histamin nicht (25,60).

Das Vorkommen des Enzyms wurde bisher nur im Magen der Maus (25,78), des Meerschweinchens (25,78, 9, 142), des Kaninchens (25,78), der Katze (25,78), des Hundes (78, 100) und

des menschlichen Foetus (89) sowie von Lorenz et al. (100) erstmals im Magen des Schweines, des Rindes und des Menschen nachgewiesen. Keine HMT-Aktivität fand sich im Magen der Ratte (25, 78). Eine Charakterisierung oder Reinigung des Enzyms aus Magengewebe irgendeiner Spezies wurde bisher noch nicht unternommen.

1.3. Hemmung der Histaminmethyltransferase

Wegen der Bedeutung der HMT für den Histaminstoffwechsel wurde intensiv nach geeigneten, möglichst wirksamen und wenig toxischen Inhibitoren gesucht (s. Tab. 4). Die Reaktionsprodukte 1(τ)-Methylhistamin und SAH, SH-Gruppen-Reagenzien, Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen sowie Antimalariamittel vom Typ des 4-Aminochinolins und 2-Brom-Lysergsäurediäthylamid zeigten eine starke Hemmung des Enzyms ($\text{ID}_{50} < 10^{-4} \text{M}$).

Über den Mechanismus der Hemmung der HMT durch die verschiedenen in Tab. 4 genannten Substanzen ist bisher wenig bekannt. Nur der Effekt der bei der Methylierungsreaktion gebildeten Produkte wurde bisher eingehender untersucht. 1(τ)-Methylhistamin und Histaminderivate wie N',N'-Dimethylhistamin (60) oder Histaminanaloga wie 3-(β -Aminoäthyl)-pyrazol (88) hemmten das Enzym kompetitiv in Bezug auf Histamin, während das Produkt SAH ein kompetitiver Hemmstoff für SAM und ein nichtkompetitiver für Histamin war (15). Alle bisher bekannten Antihistaminika hemmten die HMT aus Mäusehirn kompetitiv (140). Für die Hemmung des Enzyms aus Katzeniere durch Vitamine wurde eine kompetitive Hemmung gegen Histamin und eine nichtkompetitive gegen SAM gefunden (146).

Als in vivo Hemmstoffe der HMT wurden bisher nur 1(τ)-Methylhistamin (127, 128, 129, 122, 123, 124, 131), Amodiachin (36, 128), Cu^{2+} -Ionen (158), der H_1 -Rezeptorantagonist Chlorpromazin (158, 159, 131, 123) sowie der H_2 -Rezeptorantagonist Burimamid (114) untersucht. Die Enzymhemmung wurde entweder mittels der Abnahme des 1(τ)-Methylhistamingehalts in den

Substanzen	Literatur
S-Adenosyl-L-homocystein	25, 87, 15
S-Adenosyl-L-homocystein-analoge	23, 24
S-Adenosyl-L-methionin-analoge	160
Histaminanaloge	88, 60
Substrate anderer N-Methyltrans- ferasen	87
SH-Reagenzien	25, 87, 60, 143
SH-Gruppen schützende Substanzen	25, 87, 60
2-wertige Metallionen	25, 87, 60, 140
Anorganische Anionen	25, 60
Komplexbildner	87, 10, 60
Histidin und Histidinderivate	25, 87, 140
Biogene Amine	25, 87, 60, 113, 140
Synthetische Histaminliberatoren	25
Mono- und Diaminoxidasehemmstoffe	87, 140
Antihistaminica	25, 60, 35, 113, 117, 140, 142
Antimalariamittel	35, 140
Alkaloide und deren Derivate	25, 60
Zentral wirkende synthetische Pharmaka	25, 60
Vitamine	146

Tab. 4 Substanzgruppen, deren aktivierende oder hemmende Wirkung in vitro auf die HMT bisher untersucht wurden

Die Enzymquellen für die verwendeten HMT-Präparate verschiedener Anreicherung waren Meerschweinchenhirn, Mäusehirn, Schweineleber, Katzen- und Rattenniere.

Gewebe bzw. Perfusionsflüssigkeiten oder durch Zunahme der Histaminausscheidung im Harn bestimmt. Mit Ausnahme des Chlorpromazins verminderten die genannten Stoffe die Methylierung des Histamins in vivo.

1.4. Ziel der Arbeit

Um über die physiologische Bedeutung der HMT bei der Regulation der aktiven Menge Histamins am Rezeptor der Belegzelle eine Aussage treffen zu können, wurden folgende Ziele verfolgt:

1. Erarbeitung von zuverlässigen Methoden zur Bestimmung der HMT-Aktivität im Gewebe.
2. Nachweis des Enzyms in der Magenschleimhaut des Menschen und verschiedener Säugetiere.
3. Eine möglichst hohe Anreicherung der HMT aus diesem Gewebe.
4. Ermittlung von enzymatischen Eigenschaften der HMT, besonders derjenigen, die den Reaktionsmechanismus und die mögliche Funktion des Enzyms in vivo betreffen könnten (Substratoptima, Einfluß von Ionen etc.).
5. In-vitro-Untersuchungen von möglichen Hemmstoffen des Enzyms, um aus dieser Gruppe möglichst spezifische und wirksame Verbindungen für eine in-vivo-Beeinflussung der Enzymaktivität herauszufinden.
6. In-vitro-Untersuchung der Effekte von Stoffen auf die Enzymaktivität, die bereits auf die pharmakologische Wirkung von Histamin einen Einfluß nehmen, beispielsweise durch agonistische oder antagonistische Wirkung an H_1 - und H_2 -Rezeptoren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Tier- und Gewebematerial

Schweinemägen stammten von erwachsenen weiblichen Tieren (100-150 kg schwer, Rasse Deutsches Edelschwein) und wurden unmittelbar nach Tötung durch Elektroschock im Schlachthaus entnommen. Die Schleimhaut menschlicher Mägen wurde durch Resektionen bei Gastrektomie nach Billroth II gewonnen. Hundemägen stammten von Bastardlabortieren. Rindermägen wurden unmittelbar nach Tötung der Tiere durch Bolzenschlag im Schlachthaus entnommen. Meerschweinchen (400 g, weiblich, eigener Laborstamm) wurden durch Kopfschlag getötet und nach dem

Entbluten die Gehirne freigelegt.

Die Organe wurden unmittelbar nach Entnahme mit eiskalter Tyrode-Lösung gewaschen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bei den Mägen wurde vor dem Einfrieren die gesamte Schleimhaut von der Lamina muscularis abpräpariert. Für einige Experimente wurde der Magen vor dieser Präparation entlang der Circulärmuskulatur in streifenförmige Stücke von ca. 2-4 cm Breite zerlegt. Die so gewonnenen Gewebeproben wurden bei -20°C gelagert.

2.1.2. Enzympräparationen

Alle Schritte zur Präparation der Rohhomogenate und zu einer teilweisen Reinigung des Enzyms wurden bei $0-2^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

2.1.2.1. Rohhomogenate

Zur Frage der Verteilung und des Vorkommens von HMT in verschiedenen Mägen wurde eine einfache Enzympräparation gewählt. Dazu wurden die gefrorenen Gewebe mit 2 Volumina 0,25 M Sucrose (pH des Homogenats 6,8) oder 0,01 M Natriumphosphatpuffer (NaPP), pH 7,4, mit einem Ultraturrax (Typ 18/2N, Jahnke und Kunkel, Stauffen) homogenisiert und das Homogenat 45 min bei einer mittleren Beschleunigung von 143.000 g (Spinco L2 75 B, Beckman, München) zentrifugiert. Der Überstand diente als Enzymquelle.

2.1.2.2. Teilreinigung der HMT aus Meerschweinchenhirn

Um eine Vergleichsmöglichkeit für die im folgenden beschriebene Anreicherung der HMT aus Schweinemagen zu haben, wurde die von Brown et al. (25) beschriebene Teilreinigung des Enzyms aus Meerschweinchenhirn durchgeführt. Dazu wurde der Überstand des Ultrazentrifugates von 30 Meerschweinchenhirnen (98,0 g) mit 196 ml 0,25 M Sucrose homogenisiert (pH des Homogenats 6,9) und 45 min bei 143.000 g zentrifugiert. 150 ml des erhaltenen Überstandes wurden unter kontinuierlichem Rühren 10 min mit 41,5 g Ammoniumsulfat (45% Sättigung) versetzt und 10 min bei 20.000 g (Sorvall RC 2B, Hormuth und

Vetter, Wiesloch) abzentrifugiert. Zum Überstand wurden dann 25,6 g Ammoniumsulfat gegeben (70% Sättigung). Die Suspension wurde 10 min gerührt und 10 min bei 20.000 g zentrifugiert. Der erhaltene Niederschlag wurde in 15 ml 0,02 M NaPP, pH 7,4, aufgenommen und die Lösung über Sephadex G 25 (4 cm Ø, 100 cm lang, äquilibriert mit 0,02 M NaPP, pH 7,4) entsalzt. Der Proteingipfel des Effluats wurde mittels eines UV-Absorptionsspektrometers bei 280 nm (Uvicord II, LKB, Bromma) bestimmt und die Protein enthaltende Lösung direkt zur Enzymbestimmung eingesetzt. (Zur Methode der Enzymaktivitätsbestimmung s. 2.2.1.2. und 2.2.2.3.) Das erhaltene Präparat zeigte eine 16fache Anreicherung gegenüber dem Rohhomogenat bei einer Gesamtaktivitätsausbeute von 83%.

2.1.2.3. Anreicherung der HMT aus Schweineantrum mucosa

Die spezifische Aktivität der HMT ist in der Magenschleimhaut der verschiedenen Spezies 2-5fach höher als im Meerschweinchenhirn. Die höchste spezifische Aktivität findet man in der Antrumschleimhaut des erwachsenen Schweines (s.3.2.). Deshalb wurde aus dem Magengewebe dieser Spezies eine weitergehende Anreicherung des Enzyms vorgenommen.

1. Schritt: Homogenisation und Ultrazentrifugation.

Aus den Mägen von 17 Schweinen wurden 880 g Antrumschleimhaut gewonnen. Diese wurden nach Zugabe von 2 Volumina eiskalter 0,25 M Sucrose zuerst mit einem Küchenmixer (Waring Blender) zerkleinert und dann mit einem Ultraturrax homogenisiert. Eine 45 min Zentrifugation des Homogenates bei 143.000 g ergab 1700 ml Überstand.

2. Schritt: Ammonsulfatfraktionierung.

Dieser Überstand wurde einer Ammonsulfatfraktionierung (60-80% Sättigung) nach 2.1.2.2. unterworfen. Das 2. Präzipitat wurde in 80 ml 0,02 M NaPP, pH 7,4, aufgenommen, an einer Sephadex G 25-Säule (4,0 cm Ø, 100 cm lang, äquilibriert mit 0,02 M NaPP, pH 7,4), entsalzt und anschließend lyophilisiert (Lyophilisationsanlage Delta IIA, Christ, Aichach).

3. Schritt: Anreicherung an DEAE-Cellulose.

340 mg dieses Enzympräparates wurden in 20 ml bidestilliertem

Wasser aufgenommen und auf eine Säule von DEAE-Cellulose (5,0 cm Ø, 20 cm lang, äquili-
briert mit 0,01 M NaPP, pH 7,4)
aufgebracht. Die Säule wurde mit 3000 ml 0,01 M NaPP, pH 7,4,
gewaschen. Nicht adsorbiertes Protein und die Waschflüssig-
keit wurden auf Enzymaktivität untersucht. Die Elution des
Enzyms erfolgte durch einen kontinuierlichen, konvexen Koch-
salzgradienten. In die Mischkammer von 250 ml, die zu Beginn
der Elution 0,01 M NaPP, pH 7,4, enthielt, lief aus einem
Vorratsgefäß derselbe NaPP, der 2 M an Kochsalz war, zu. Die
Elutionsrate betrug 96 ml/h. Das Erscheinen der Proteine im
Eluat wurde mit einem UV-Absorptionsspektrometer bei 280 nm,
die Änderung der Leitfähigkeit mit Hilfe eines Konduktometers
(LF 39, WTW, Weilheim) verfolgt. Das Eluat wurde in 5 ml
Portionen gesammelt (Ultrorac, LKB, Bromma) und dem Enzym-
test zugeführt. Die Fraktionen des 3. Elutionsgipfels ent-
hielten die höchste HMT-Aktivität und wurden deshalb ver-
einigt, an einer Säule von Sephadex G 25 (Bedingungen s. oben)
entsalzt und lyophilisiert.

4. Schritt: Gelfiltration an Sephadex G 100.

Dieses Lyophilisat wurde in 6 ml Wasser aufgenommen und auf
eine Sephadex G 100-Säule (1,5 cm Ø, 60 cm lang, äquili-
briert mit 0,02 M NaPP, pH 7,4) gebracht. Das Eluat wurde
in 5 ml Fraktionen gesammelt und direkt zum Test der Enzym-
aktivität verwendet. 1,0 ml dieser Enzymlösung entsprachen
0,2 mg Protein (Methoden der Enzymaktivitätsbestimmung s.
2.2.1.1. und 2.2.2.2.).

2.1.2.4. Modifizierung der Anreicherung der iMT aus Schweine- antrum mucosa

Die hohen Verluste an Gesamtaktivität bei der oben beschrie-
benen Ammonsulfatfällung und die Suche nach einer einfache-
ren Arbeitsweise veranlaßten uns, für größere Versuchsserien
die unter 2.1.2.3. beschriebene Reinigung zu vereinfachen.
Der 1. Schritt wurde voll beibehalten, der 2. Schritt entfiel.

Die Elution des Enzyms im 3. Schritt erfolgte statt durch einen kontinuierlichen Salzgradienten durch einen Stufengradienten, für den 2x500 ml und 1000 ml Elutionspuffer (0,01 M NaPP, pH 7,4) verwendet wurde, der Kochsalz in 0,2 M (500 ml), 0,5 M (500 ml) und 1,0 M (1000 ml) Konzentration enthielt. Der 4. Schritt wurde wegen der relativen Instabilität des Präparates (s. 3.5.1.) nach Gelfiltration an Sephadex G 100 ebenfalls weggelassen. Die Fraktionen mit der höchsten Enzymaktivität wurden gesammelt, gemischt und ohne Entsalzen eingefroren.

2.1.2.5. Dialyse und weitere, nicht regelmäßig angewandte Verfahren zur Enzymreinigung

Dialyse

Um das kochsalzhaltige Eluat der DEAE- bzw. Hydroxylapatitssäulen zu entsalzen, wurden in einem Gefäß jeweils 130-160 ml des Eluats, das die vereinigten Fraktionen mit der höchsten Enzymaktivität enthielt, gegen 5000 ml 0,01 M NaPP, pH 7,4, mit einmaligem Wechsel des Mediums für 6-12 Stunden dialysiert (Dialysierschlauch 15 mm breit; Kalle, Wiesbaden). Die Kühlung des Dialysemediums auf 0-2°C erfolgte durch einen Tauchkühler (TK67, Colora, Lorch). In einigen Fällen (s. 3.4.2.) wurde dem Dialysemedium Glutathion in 10⁻³M Konzentration zugegeben.

Fällung von Fremdproteinen

durch Hitze: Je 15 ml eines Überstandes nach Ultrazentrifugation wurden in Stahlbechern, die in Thermostaten mit einer Badtemperatur von 48°, 55°, 58°, 61°, 64° und 70°C für jeweils 5, 10 und 15 min eingehängt waren, kontinuierlich gerührt und anschließend sofort im Eisbad abgekühlt. Eine Beeinflussung der Enzymaktivität durch das Bechermaterial konnte in Kontrollansätzen mit den normalen, für die Inkubationen verwendeten Glasgefäßen ausgeschlossen werden. Der pH-Wert der Enzymlösung änderte sich durch die Hitzefällung nicht.

durch Äthanol: Je 15 ml eines Überstandes nach Ultrazentri-

fugation wurden unter kontinuierlichem Rühren bei 0-2°C mit je 15 ml absolutem, 80%igem, 60%igem und 40%igem Alkohol versetzt und für 15 min belassen.

durch Erniedrigung des pH: Je 8 ml eines Überstandes nach Ultrazentrifugation wurden bei 0-2°C mit 2 ml 0,2 M Acetat-Puffer mit einem pH von 5,3, 5,0, 4,7, 4,4 oder 4,1 versetzt oder mit 0,1 N HCl an der Glaselektrode auf noch niedrigere pH-Werte eingestellt. Nach 10 min wurde mit 0,1 N NaOH wiederum an der Glaselektrode der pH-Wert auf 7,4 zurückgestellt.

Das durch die drei verschiedenen Methoden ausgefällte Protein wurde 15 min bei 50.000 g abzentrifugiert und der erhaltene Überstand mit einigen Tropfen 0,1 - 1 N NaOH auf einen pH zwischen 7,0 und 7,6 gebracht, während der Niederschlag in 2 ml 0,05 M NaPP, pH 7,4, aufgenommen wurde. Die so erhaltenen Präparate wurden zur Inkubation verwendet.

Säulenchromatographieverfahren

Anreicherungsversuche mittels TEAE-Cellulose und Hydroxylapatit wurden entsprechend den Bedingungen durchgeführt, die bereits unter 2.1.2.3. (kontinuierliche Elution) und 2.1.2.4. (diskontinuierliche Elution) für die Chromatographie an DEAE-Cellulose beschrieben wurden.

2.1.3. Reagenzien

Zur Zubereitung sämtlicher Lösungen, Puffergemische und Dialysemedien wurde ausschließlich bidestilliertes Wasser (Bidestillationsanlage, 2. Stufe Quarzglas, Typ 1108; Köttermann, Hänsingen) verwendet.

2.1.3.1. Zu den Inkubationsansätzen

Histamin dihydrochlorid puriss. (Fluka, Buchs), S-Adenosyl-L-methionin Hydrogensulfat (Boehringer, Mannheim), S-Adenosyl-

L-[methyl- ^{14}C]methionin⁺), S-Adenosyl-L-[carboxyl- ^{14}C]methionin, 5-[^{14}C]Methyltetrahydrofolsäure (Bariumsalz), ^{14}C -Toluol-standard (alle Buchler, Braunschweig); S-Adenosyl-L-[methyl- ^{14}C]methionin⁺ (New England Nuclear, Dreieichenhain); D(+)-Saccharose puriss., Aminoguanidinsulfat p.a., Nicotinamid p.a., Methanol, Äthanol, n-Heptan, n-Butanol, Eisessig (alle "Uvasol"^(R)); 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 2,2'-p-Phenylene-bis-(5-phenyl-oxazol) (POPOP), Toluol (alle "für Szintillationsmessungen"); Isoamylalkohol p.a., alle anorganischen Salze, Säuren und Basen p.a., Triton X 100 (alle Merck, Darmstadt); o-Phthaldialdehyd puriss. p.a. (umkristallisiert aus Petroläther, Siedebereich 40-60°C, Fluka, Buchs); Soluene 100 (Packard Instruments, Frankfurt).

2.1.3.2. Zur Proteinbestimmung

Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz (Merck, Darmstadt), Albumin aus Rinderserum, reinst, Albumin aus Humanserum, reinst (Serva, Heidelberg).

2.1.3.3. Ionenaustauscher

Dowex 50 W-X 8, H⁺-Form, mesh 200-400; DEAE-Cellulose-SS p.a. 50-200 μ , TEAE-Cellulose p.a., 50-200 μ , Hydroxylapatit-Neocel p.a. (alle Serva, Heidelberg), Sephadex G 25 fine, G 50, G 100 (Deutsche Pharmacia Gesellschaft, Frankfurt).

2.1.3.4. Zur Dünnschichtchromatographie

DC-Fertigplatten Cellulose (20 x 20 cm; 0,1 mm Beschichtung); Ninhydrin (Sprühreagenz 0,1%ig), Jod, 25% Ammoniak (alle Suprapur^(R)), Methanol, Äthanol abs., Chloroform, Diäthyläther (alle Uvasol^(R)) (alle Merck, Darmstadt).

⁺) schwefelsaure Lösung (pH 2-3). Bei -20°C 4% Zerfall innerhalb eines Jahres, bei Zimmertemperatur 3-4% innerhalb von 24h; Zerfallsprodukte durch Hydrolyse sind 5'-Methyladenosin und Homoserin (11); durch Radiolyse können auch geringe Mengen SAH und Methanol entstehen (46).

2.1.4. Substrat- und Produktanaloge

2.1.4.1. Histaminanaloge⁺

1(7)-Methylhistamin, 2-Methylhistamin, 3(7)-Methylhistamin, 5-Methylhistamin, N'-Methylhistamin und N',N'-Dimethylhistamin wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. J.W. Black (Smith, Kline & French Laboratories Ltd., Welwyn Garden City) überlassen. Sowohl fluorometrisch (98) als auch dünnschicht-chromatographisch in drei Laufmitteln (Äthanol/25%iger Ammoniak 4:1; Äthanol/Diäthyläther/25%iger Ammoniak/Wasser 8:10:1:2; Äthanol/25%iger Ammoniak/Wasser 10:1:1; Anfärben der Chromatogramme mit Jod oder Ninhydrin, (s. auch 2.2.3.1.)) konnte gezeigt werden, daß diese Substanzen frei von Histamin waren. Imidazolessigsäure, Imidazolbrenztraubensäure und 1-Methyl-4-Imidazolessigsäure wurden von Calbiochem (Luzern) bezogen; 4-Aminomethylimidazol, N-Acetylimidazolylglycin und Imidazolylglycin wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. F. Schneider (Universität Marburg) überlassen.

2.1.4.2. S-Adenosyl-L-homocystein-analoga

Die Formeln und Bezeichnungen der in dieser Arbeit untersuchten SAH-Analogen sind aus Abb. 2 zu ersehen.

2.1.5. Hemmstoffe und Pharmaka

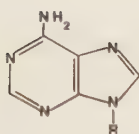
2.1.5.1. SH-Blocker und SH-Gruppen schützende Substanzen

L-Cystein (Fluka, Buchs), Mercaptoäthanol, p-Hydroxymercuribenzoessäure (Natrium-Salz), N-Äthylmaleimid, Jodacetamid, Dithioerythrit (alle Serva, Heidelberg), Glutathion (reduziert) (Merck, Darmstadt). So weit notwendig, wurden die Reagenzien unter Stickstoff aufbewahrt.

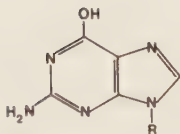
2.1.5.2. Salze und Komplexbildner

Alle in Tab. 19 aufgeführten Salze sowie EDTA wurden von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen (Reinheitsgrad p.a.).

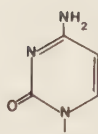
⁺) Die Positionen des Imidazolrings wurden nach den IUPAC-Regeln für Heterozyklen numeriert; das Stickstoffatom der Aminoäthylseitenkette wurde N' benannt (vgl. (21)).



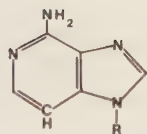
(1)



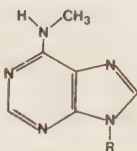
(2)



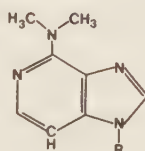
(3)



(4)



(5)



(6)

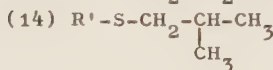
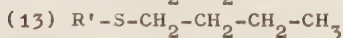
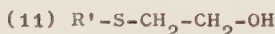
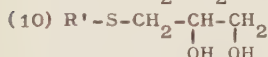
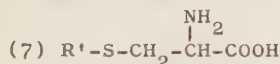


Abb. 2 Strukturformeln der SAH-Analogen

R: Ribose-Homocystein; R': Adenosyl

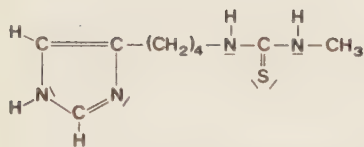
(1) S-Adenosyl-L-homocystein (Boehringer, Mannheim); S-Adenosyl-D-homocystein⁺); (2) S-Guanosyl-D,L-homocystein⁺); (3) S-Cytidyl-L-homocystein⁺⁺); (4) S-3-Deazaadenosyl-D,L-homocystein (4-Amino-1-(β-D-ribofuranosyl)imidazo-[4,5-c]pyridyl-5'-S-L-homocystein⁺⁺); (5) S-(N⁶-Methyladenosyl)-D,L-homocystein⁺); (6) S-(N⁶,3-Dimethyl-3-deazaadenosyl)-L-homocystein (4-Dimethyl-amino-1-(β-D-ribofuranosyl)imidazo[4,5-c]pyridyl-5'-S-L-homocystein⁺⁺); (7) S-Adenosyl-L-cystein⁺); (8) S-Adenosyl-cysteamin⁺); (9) S-Adenosyl-3-thiopropionsäure⁺); (10) S-Adenosyl-thiopropion-1,2-diol⁺); (11) S-Adenosyl-thioäthanol⁺); (12) O-Hydroxyäthyl-adenosin⁺); (13) S-Butyl-adenosin⁺); (14) S-Isobutyl-adenosin⁺).

Die mit +) gekennzeichneten Substanzen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Jean Hildesheim, Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette, Frankreich, und die mit ++) gekennzeichneten von Dr. Ronald T. Borchardt, Dept. of Biochemistry, University of Kansas, Lawrence, USA, zur Verfügung gestellt. Zur Präparation, Reinheit und Identifizierung dieser SAH-Analogen s. (67, 68, 69, 70, 23, 24).

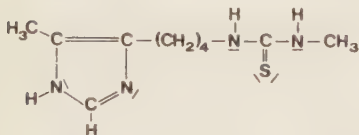
2.1.5.3. Antihistaminika und Phenothiazine

Alle Antihistaminika waren gemäß Mitteilung der Hersteller Reinsubstanzen.

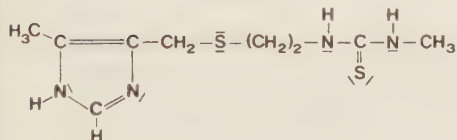
Alimemazin (Tartrat), (Repeltin^(R), Bayer, Leverkusen); Antazolin (Hydrochlorid), (Antistin^(R), Ciba-Geigy, Basel); Bamipin (Hydrochlorid), (Soventol^(R), Knoll, Ludwigshafen); Brompheniramin (Maleat), (Ilvin^(R), Merck, Darmstadt); Burimamid (Abb.3), (Smith, Kline & French, Welwyn Garden City, England); Chlorphenoxamin (Hydrochlorid), (Systral^(R), Asta, Brackwede); Chlorpromazin (Hydrochlorid), (Megaphen^(R), Bayer, Leverkusen); Chlorpyramin (Synpen^(R), Ciba-Geigy, Basel); Cinnopentazon (Scha 306, Siegfried, Säckingen); Clemastin (Fumarat), (Tavegil^(R), Sandoz, Nürnberg); Cyproheptadin (Hydrochlorid), (Periactinol^(R), Sharp & Dohme, München); Dimethpyrinden (Maleat), (Fenistil^(R), Zyma-Blaes, München); Doxylamin (Succinat), (Mereprine^(R), Iptor, Gross-Gerau); Fluphenazin (Dihydrochlorid), (Lyogen^(R), Byk-Gulden, Konstanz); Histapyrrodin (Hydrochlorid), (Luvistin^(R), Boehringer, Mannheim); HÖ 467 (Maleinat), HÖ 482 (Diphosphat), HÖ 505 (Phosphat) (Abb. 3) (alle Bayer, Leverkusen); Homophenazin (Dihydrochlorid), (Pasaden^(R), Homburg, Frankfurt); Isothipendyl (Andantol^(R), Homburg, Frankfurt); Mebhydrolin (Omeril^(R), Bayer, Leverkusen); Mepyramin (Maleat), (Neo-Bridal^(R), Bayer, Leverkusen); 5-Methylburimamid (Abb. 3), (Smith, Kline & French, Welwyn Garden City, England); Metiamid (Abb. 3), (Smith, Kline & French, Welwyn Garden City, England); Pecazin (Pacatal^(R), Promonta, Hamburg); Perazin (Dimalonat), (Taxilan^(R), Promonta, Hamburg); Perpheanzin (Dihydrochlorid), (Decentan^(R), Merck, Darmstadt); Piprinhydrinat (Kolton^(R), Promonta, Hamburg); Promethazin (Hydrochlorid), (Atosil^(R), Bayer, Leverkusen); Propericiazin (Aolept^(R), Bayer, Leverkusen); Trifluperazin (Dihydrochlorid), (Jatroneural^(R), Röhm & Haas, Darmstadt); Triflupromazin (Hydrochlorid), (Psyquil^(R), Heyden, München); Tripelennamin (Pyribenzamin^(R), Ciba-Geigy, Basel); Tolpropamin (Hydrochlorid, (Pragman^(R), Albert, Frankfurt);



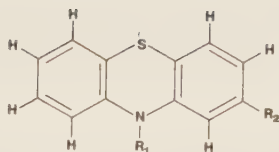
Burimamid



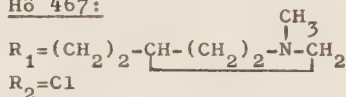
5-Methylburimamid



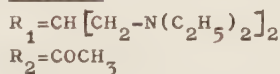
Metiamid



Hö 467:



Hö 482:



Hö 505:

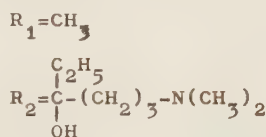


Abb. 3 Strukturformeln einiger H₁- und H₂-Rezeptorantagonisten

Burimamid (N-Methyl-N' [4-(4(5)-imidazolyl)butyl] thioharnstoff); 5-Methylburimamid (N-Methyl-N' [4-(5-methylimidazol-4-yl)butyl] thioharnstoff); Metiamid (N-Methyl-N' [2((5-methylimidazol-4-yl)methylthio)äthyl] thioharnstoff. Hö 467 (2-Chloro-10-[2-(1-methyl-pyrrolidin-3-yl)äthyl]-phenothiazin(maleinat)); Hö 482 (2-Methoxy-10-[2,2'-(diäthylamino)-isopropyl]-phenothiazin(diphosphat)); Hö 505 (10-Methyl-2-[4-(dimethylamino)-2-hydroxy,2-äthyl-butyl]-phenothiazin(phosphat)). Letztere 3 Substanzen wurden von Herrn Dr. Hörlein, Farbenfabriken Bayer, synthetisiert.

2.1.5.4. Antimalariamittel

Amodiachin und Chlorochin (Reinsubstanzen) wurden uns freundlicherweise von Dr. R. Wolf, Parke Davis, München, überlassen.

2.2. Methoden

2.2.1. Bestimmung der enzymatischen Aktivität der HMT

2.2.1.1. Isotopenmethode (modifiziert nach 137)

Prinzip der Methode

Diese Methode ermöglicht die Bestimmung eines Reaktionsproduktes der durch HMT katalysierten Reaktion, nämlich des 1(7)-Methylhistamins.

Zusammensetzung der Inkubationsgemische

Zur Enzymaktivitätsbestimmung waren in einem Ansatz von 0,5 ml Gesamtvolumen die in Tab. 5 angegebenen Substanzen enthalten.

Komponenten des Reaktions- gemisches	Volumen [μ l]	Konzentration [mM]	Endkonz. [mM]	Menge/Ansatz [μ mol]
NaPP, pH 7,4	200	50	45	22,5
Enzymlösung	100	-	-	-
Histamin	100	0,584	0,117	0,058
SAM ¹⁾	50	5	0,7	0,35
¹⁴ C-SAM ²⁾³⁾	50	2		

Tab. 5 Mengen-, Volumen- und Konzentrationsangaben der einzelnen Komponenten des Inkubationsgemisches für die Bestimmung der HMT-Aktivität mittels des Isotopen-Enzymtestes

Enzymprotein, Histamin und nicht radioaktives SAM waren in 0,05 M NaPP, pH 7,4, gelöst.

- 1) Die Einwaage muß mit dem Faktor 1,724 multipliziert werden, da nach Angaben des Herstellers nur 58% der Substanz reines SAM sind.
- 2) Gelöst in Schwefelsäure, pH 2,0-3,0.
- 3) Spezifische Aktivität 0,51 mCi/mmol $\hat{=}$ 51 nCi/Ansatz $\hat{=}$ 113 220 dpm/Ansatz.

Für Fragestellungen wie Bestimmung von Michaeliskonstanten, Hemmstoffwirkungen und Substratspezifitäten wurden dagegen die in Tab. 6 angegebenen Konzentrationen der einzelnen Reaktionspartner gewählt.

Bestimmung von	Histamin [μM]	SAM [μM]	Hemmstoff oder Substrat, 100 μl , [μM]	NaPP [μl]
K_m (Histamin)	3,1-800	100	-	200
K_m (SAM)	117	1-80	-	200
Hemmstoffwirkung	117	700	0,1-10.000	100
Donorsubstratspezifität	117	-	700	200
Akzeptorsubstratspezifität	-	700	117	200

Tab. 6 Modifizierte Inkubationsbedingungen (nur Endkonzentrationen) für die Bestimmung von Michaeliskonstanten, Hemmstoffwirkungen und Substratspezifitäten

Durchführung der Inkubationen

Die Inkubationen wurden in Reagenzgläsern mit Glasschliff unter Luftatmosphäre bei 37°C in einem Thermoblock (CH 12, Liebisch, Brackwede) durchgeführt. Die Reihenfolge der Zugabe der Reaktionsteilnehmer und eine Vorinkubation waren ohne Einfluß auf die Enzymaktivität (s. 3.1.1.3.). Die Reaktion wurde durch Zugabe von SAM gestartet. Nach 0, 15, 30, 45 und 60 min wurde durch Zugabe von 0,5 ml 0,5 M Boratpuffer, pH 10,0, die Reaktion in den einzelnen Ansätzen abgestoppt.

Extraktion von 1(τ)-Methylhistamin aus dem Inkubationsgemisch und Messung von ^{14}C -1(τ)-Methylhistamin

Nach dem Abstoppen der Reaktion wurde das gebildete ^{14}C -1(τ)-Methylhistamin durch mechanisches Schütteln für 15 min auf

einem Horizontalrüttler (Bühler, Tübingen) in 6 ml Toluol-Isoamylalkohol-Gemisch (3:2 v/v) überführt. Wässrige und organische Phase wurden durch 5 min Zentrifugation bei 1800 g getrennt. 4 ml des Überstandes wurden in Polyäthylen-Szintillationsflaschen (Hormuth, Heidelberg) übertragen, in denen sich 2 ml absolutes Äthanol und 10 ml Toluol-Szintillator (0,4% PPO und 0,01% POPOP) befanden. Im Flüssigszintillationszähler (TriCarb 3380, Packard, Frankfurt) wurde die enthaltene Radioaktivität mit dem im Gerät vorgegebenen ^{14}C -Kanal auf $\pm 1,5\%$ (2 σ -Grenzen) genau bestimmt. Von Hand eingestellte Kanalfenster und Verstärkungen lieferten keine Verbesserung der Zählausebeute.

Ermittlung der HMT-Aktivität

Zur Bestimmung eines einzelnen Wertes der HMT-Aktivität wurden neben vier Inkubationsansätzen, die nach 15, 30, 45 und 60 min abgestoppt wurden, vier weitere Ansätze mit hitzeinaktiviertem Enzym vorbereitet (zur Hitzeinaktivierung wurde 1 ml der Enzymlösung in mit Schliffstopfen verschlossenen Reagenzgläsern für 10 min in kochendem Wasser belassen). Dadurch wurde ein Hinweis für die Radioaktivität erhalten, die von anderen Stoffen als dem enzymatisch gebildeten ^{14}C -1(L)-Methylhistamin stammte (Hydrolyseprodukte, Verunreinigungen). Bei den großen Inkubationsreihen, die für die in Tab. 6 genannten Fälle notwendig waren, wurden pro Aktivitätsbestimmung nur 2 Inkubationen (30 und 60 min Inkubationszeit) mit den dazugehörigen Ansätzen mit hitzeinaktiviertem Enzym durchgeführt.

Im Regelfall (s. oben) wurden außer diesen 8 Ansätzen 3 weitere zur Kontrolle der Spezifität des Enzymtests durchgeführt: Im ersten waren die 0,1 ml Enzymlösung durch 0,1 ml 0,01 M NaPP, pH 7,4, ersetzt. Beim zweiten wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml Boratpuffer, pH 10,0, unmittelbar vor Zugabe des SAM (Zeit 0 min) abgestoppt und das Inkubationsgemisch 60 min bei 37°C gehalten. Der dritte Kontrollansatz

enthielt Amodiachin, einen starken Hemmstoff der HMT (s. 3.5.4.6.) in $10^{-3}M$ Konzentration. Alle diese Blankwerte stimmten mit den Werten, die mit hitzeinaktiviertem Enzym erhalten wurden, überein. Die Werte stiegen von 80 cpm für die zur Zeit 0 min abgestoppten Ansätze an bis auf 150 cpm für die Inkubationen von 60 min. Ein gerätebedingter Background von 30 cpm wurde durch automatische Subtraktion am Szintillationszähler berücksichtigt.

Aus den nach verschiedenen Zeiten abgestoppten Ansätzen wurde die Zunahme des in das Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch extrahierten ^{14}C -1(τ)-Methylhistamins bestimmt. Von diesen Werten wurden die Nullwerte und zusätzlich die durch die anderen Blanks ermittelte und unspezifisch extrahierte Radioaktivität, die im Durchschnitt bei 1,16 cpm/min (Extremwerte 1,0-1,5 cpm/min) lag, abgezogen. Als Reaktionsgeschwindigkeit wurden dann cpm/min berechnet. Das arithmetische Mittel aus diesen vier Werten lieferte dann die lineare Anfangsgeschwindigkeit, aus der die spezifische Aktivität der HMT als pmol abgebautes Histamin/(min x mg Protein) errechnet wurde.

2.2.1.2. Fluorometrische Methode (s. 100)

Prinzip der Methode

Bei dieser Methode wird die Aktivität der HMT durch den Verbrauch des Substrates Histamin bestimmt.

Zusammensetzung der Inkubationsgemische

Die Inkubationsgemische von 4 ml Gesamtvolumen wurden in 25 ml Erlenmeyerkolben im Eisbad vorbereitet (Zusammensetzung s. Tab. 7).

Durchführung der Inkubationen

Die Ansätze wurden in einem Schüttelwasserbad (Köttermann, Hänsingen) unter Luftatmosphäre bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Nach einer Vorinkubation aller Reaktionspartner ohne SAM von 10 min bei $37^{\circ}C$ wurde die Reaktion durch die Zugabe von SAM gestartet. Nach jeweils 10, 20, 30 min wurde die Reaktion in einem

Komponenten des Reaktions- gemisches	Volumen [ml]	Konzentration [mM]	Endkonz. [mM]	Menge/Ansatz [μmol]
Sucrose	1,0	250	125 (62,5) 1)	500 (250) 1)
NaPP, pH 7,4	1,1	50	24 (36) 1)	95 (145) 1)
Nicotinamid	0,1	400	10	40
Aminoguanidin- sulfat	0,1	4	0,1	0,4
Enzymlösung	1,0	-	-	-
Histamin	0,5	0,584	0,073 (0,08-0,12)	0,292 (0,32 - 0,48)
SAM ²⁾	0,2	5	0,25	1,0

Tab. 7 Mengen-, Volumen- und Konzentrationsangaben der einzelnen Komponenten des Inkubationsgemisches für die Bestimmung der HMT-Aktivität mittels des fluorometrischen Testes

Histamin, SAM, Aminoguanidinsulfat und Nicotinamid waren in 0,05 M NaPP, pH 7,4, gelöst.

- 1) Diese Werte treffen für einige Inkubationen zu, bei denen das Enzym nicht in 0,25 M Sucrose, sondern in 0,05 M NaPP, pH 7,4, homogenisiert wurde.
- 2) Die Einwäge muß mit dem Faktor 1,724 multipliziert werden, da nach Angaben des Herstellers nur 58% der Substanz reines SAM sind.

der Ansätze durch die Zugabe von 1,0 ml 2 N HClO₄ abgestoppt. Ausgefallenes Protein wurde durch 5 min Zentrifugieren bei 1800 g abgetrennt und der Überstand zur Bestimmung des nicht umgesetzten Histamins verwendet.

Isolierung und Bestimmung des nicht umgesetzten Histamins in den Inkubationsansätzen

Da verschiedene im Homogenat und damit auch in den Inkubationsansätzen vorhandene Stoffe die fluorometrische Bestimmung des Histamins stören können (100), mußte das Amin vor der

Kondensation mit o-Phthaldialdehyd aus diesen Ansätzen isoliert bzw. von den interferierenden Substanzen abgetrennt werden. Hierzu bot sich die Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50 W-X 8 an, der bei pH 6,5 stark basische Amine, wie Histamin bindet. Die Spezifität dieses Verfahrens (modifiziert nach 147) wurde in eigenen Versuchen umfassend geprüft (100).

Zu je 3 ml des Perchlorsäureüberstandes (s. oben) wurden 0,6 ml 2 N NaOH und 10 ml 0,1 M NaPP, pH 6,5, gegeben. Diese Lösung wurde auf ein Säulchen von Dowex 50 W-X 8 (0,3 cm Ø, 2 cm lang, Flüssigkeitsreservoir ca. 13 ml, äquilibriert mit 0,1 M NaPP, pH 6,5) aufgetragen. Danach wurde die Säule sukzessive mit 5,0 ml 0,1 M NaPP, pH 6,5, mit 1,0 ml Wasser und mit 5,0 ml 1 N HCl gewaschen. Histamin wurde dann mit 3,0 ml 4 N HCl von der Säule eluiert.

Für die fluorometrische Bestimmung wurde das Eluat mit Wasser 1:2 verdünnt. In Doppelbestimmungen wurden je 1,7 ml dieser 6 ml Lösung mit 0,8 ml 5 N NaOH alkalisiert. Dann wurden 0,1 ml einer 1%igen (w/v) Lösung von o-Phthaldialdehyd in Methanol zugegeben und genau 2 min später durch die Zugabe von 0,6 ml 2 M H_3PO_4 die Reaktion abgestoppt und die Fluoreszenz der gebildeten Verbindung in einem Spectralfluorometer (ZFM₄C mit HTV R446 Photomultiplier, Zeiss, Oberkochen) bei $21,0 \pm 0,5^\circ C$ gemessen. Die Anregungswellenlänge war 360 nm (Spaltbreite 1,2 mm), die Emissionswellenlänge war 450 nm (Spaltbreite 0,8 mm). Der fluoreszierende Histamin-o-Phthaldialdehyd-Komplex war für mindestens eine Stunde stabil. Die Fluoreszenzintensität war einer Histaminkonzentration von 1-700 ng Histamindihydrochlorid/ml des verdünnten Eluats direkt proportional.

Ermittlung der HMT-Aktivität

Zur Bestimmung eines einzelnen Wertes der HMT-Aktivität wurden 3 Ansätze mit SAM und 3 ohne dieses Cosubstrat für 3 verschiedene Zeiten, normalerweise 10, 20, 30 min inkubiert. In diesem Zeitraum verläuft die Reaktionsgeschwindigkeit

linear (s. 3.1.2.1.). Das durch Methylierung umgesetzte Histamin wurde aus der Differenz der Histaminmengen in den 3 Inkubationsgemischen mit und denen ohne SAM ermittelt. Drei solche Differenzwerte waren nötig, da, wurde die Aktivität nur aus einem Differenzwert ermittelt, der Variationskoeffizient der Methode 19,8% (n=11) war. Aus dem arithmetischen Mittelwert dieser drei Differenzwerte errechnete sich der Histaminumsatz/min. Division durch die eingesetzte Proteinmenge ergab die spezifische Aktivität des Enzyms in pmol/(min x mg Protein).

Ansätze zur Kontrolle der Richtigkeit der fluorometrischen Methode

Eine erste Kontrolle der Richtigkeit der Bestimmung des durch die HMT katalysierten Histaminabbaus in Gegenwart von SAM wurde durch die Inkubationsansätze ohne dieses Donorsubstrat erreicht (s. oben). Histaminabnahme in diesen "Leerwerten" war ein Hinweis auf in der Enzymlösung enthaltenes SAM oder auf einen Histaminabbau durch andere Enzyme (s. 3.1.2.3.). Die in den Inkubationsansätzen enthaltene Menge des Akzeptorsubstrates Histamin (s. Tab. 7, Wertebereich in Klammern) wurde aus drei zur Zeit 0 min abgestoppten Inkubationen (a-c) bestimmt. (a) enthielt alle Inkubationskomponenten, (b) alle außer Histamin und (c) alle außer der Enzymlösung. Die Summe des Histamingehalts aus (b) und (c) mußte (a) ergeben, dessen Histamingehalt wiederum den Leerwerten (s. oben) entsprechen mußte. Weiterhin konnte aus (b) die Ausbeute an zugesetztem Histamin und aus (c) die in dem Gewebe, aus dem das Enzympräparat gewonnen worden war, enthaltene Histaminmenge bestimmt werden.

Die Richtigkeit der Histaminbestimmung wurde durch einen "Umkehrblank", einen "Reagenzienblank" und einen "Eichwert" kontrolliert. Beim Umkehrblank (für jede Histaminbestimmung durchgeführt) wurden die 1,7 ml der Histamin enthaltenden Lösung vor der Kondensation mit o-Phthaldialdehyd wieder angesäuert, so daß die nur im Alkalischen ablaufende Komplex-

bildung nicht stattfinden konnte. Fehlende Fluoreszenz dieses Umkehrblanks zeigte die Abwesenheit von fluoreszierenden Verunreinigungen an. Beim Reagenzienblank wurde die den Inkubationsansätzen entnommene, Histamin enthaltende Lösung durch 3,0 ml 0,4 N HClO_4 ersetzt. Die Fluoreszenzintensität dieses Blanks durfte die des Umkehrwertes nicht übersteigen und zeigte an, ob die verwendeten Reagenzien frei von mit o-Phthaldialdehyd reagierenden Substanzen waren. Im Eichwert schließlich wurde die Fluoreszenzintensität von 1,7 ml einer Histamin-Standardlösung (0,5 $\mu\text{g/ml}$ 2 N HCl) nach Kondensation mit o-Phthaldialdehyd ermittelt. Wuch dieser Wert mehr als 5,4% (Variationskoeffizient der Histaminbestimmung s. 100) von der benutzten Eichkurve (0,1-0,8 μg Histamin/ml 2 N HCl) ab, so wurde eine neue Eichkurve angefertigt (z.B. nach durch Verschleiß bedingten Veränderungen am Fluorometer).

2.2.2. Proteinbestimmungsmethoden

Die spezifische Aktivität der HMT wurde immer auf die eingebrachte Enzymproteinmenge bezogen. Das Protein wurde hierzu in den Inkubationen mit Rohhomogenaten (UZ-Überstand) mittels der Biuret-Methode (156), bei den Reinigungsschritten und bei den kinetischen Untersuchungen mit gereinigtem Enzym nach der Lowry-Methode (110) oder durch UV-Absorption bei 260 nm und 280 nm (151) gemessen. Sämtliche Eichkurven hatten einen Korrelationskoeffizienten von $< 0,995$ und verliefen nach Abzug des Leerwertes durch den Nullpunkt.

2.2.2.1. Biuret-Methode

Am Photometer (Eppendorf, Hamburg) wurde eine Probe mit Enzympräparat (0,1-1,0 ml $\hat{=}$ 0,5-10 mg Protein/ml) bei 546 nm gegen einen Leerwert gemessen, der aus 5,0 ml des Biuret-Reagenz und 5,0 ml physiologischer Kochsalzlösung bestand. Wurde Albumin aus Rinderserum als Referenzsubstanz verwendet, so ergab sich für die Berechnung der Proteinkonzentration

(mg/ml) aus der Extinktionsdifferenz (ΔE) bei 0,1 ml eingesetzter Enzymlösung ein Proportionalitätsfaktor von 418.

2.2.2.2. Lowry-Methode

0,1-0,2 ml der Enzymlösung ($\hat{=}$ 10-100 μ g Protein/ml) wurden mit 2 ml täglich frisch zubereitetem Lowry-Reagenz zusammengegeben. Nach 10 min wurden 0,2 ml Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz hinzugefügt und nach weiteren 30 min die Absorption bei 772 nm am Photometer gegen einen Leerwert gemessen, bei dem die Enzymlösung durch 0,01 M NaPP, pH 7,4, ersetzt war. Messungen am Spektralphotometer (PMQII, Zeiss, Oberkochen) bei 750 bzw. 770 nm ergaben die gleichen Extinktionswerte. Eichkurven sowohl mit Albumin aus Rinderserum als auch aus Humanserum ergaben für die Bestimmung des Proportionalitätsfaktors (s. 2.2.2.1.) einen Wert von 148.

2.2.2.3. Methode nach Warburg und Christian

In einigen Fällen geringer Proteinmengen wurde dieses durch Messung der Absorption der Enzymlösung bei 260 nm und 280 nm bestimmt und die Ergebnisse nach der Formel $1,45 \cdot \Delta E_{280} - 0,74 \cdot \Delta E_{260} = \text{Protein (mg/ml)}$ berechnet.

2.2.3. Analytische und präparative Dünnschichtchromatographie zur Identifizierung und Gewinnung von ^{14}C -1(τ)-Methylhistamin

Für die Identifizierung und präparative Gewinnung von ^{14}C -1(τ)-Methylhistamin wurde dasselbe Ausgangspräparat hergestellt. Dazu wurden unter Verwendung von teilgereinigtem Enzym (s. 2.1.2.4.) 10 Inkubationsansätze, die in allen Mengen und Konzentrationen dem Isotopenansatz (s. 2.2.1.1.) entsprachen, für 240 min inkubiert, um möglichst viel Produkt zu erhalten (zum linearen Verlauf der Anfangskinetik s. 3.1.1.1.). Das gebildete 1(τ)-Methylhistamin wurde zur Abtrennung des überschüssigen ^{14}C -SAM durch 15 min Schütteln in je 6 ml Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch extrahiert. Je 5 ml

des Überstandes wurden in einen Spitzkolben übertragen und die Lösung am Rotationsverdampfer (Rotavapor R, Büchi, St. Gallen) auf ca. 1 ml eingeengt und dann auf genau 1,5 ml aufgefüllt. Diese 1,5 ml Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch dienten als Ausgangssubstanz sowohl zur dünnschichtchromatographischen Identifizierung als auch zur Gewinnung von ^{14}C -1(τ)-Methylhistamin. Durch direkte Szintillationszählung von 50 μl dieser Lösung in einer Mischung aus 2 ml absolutem Äthanol und 10 ml des Toluol-Szintillators (s. 2.2.1.1.) wurde die enthaltene, auf Transmethylierung zurückzuführende Radioaktivität nach Abzug des entsprechenden Leerwertes (bestimmt aus Kontrollansätzen mit hitzeinaktiviertem Enzym) zu 162.450 dpm berechnet.

2.2.3.1. Identifizierung des ^{14}C -markierten Produktes der durch HMT katalysierten Reaktion als ^{14}C -1(τ)-Methylhistamin

Zur Identifizierung von ^{14}C -1(τ)-Methylhistamin als Produkt der Methylierung wurde eine Radiodünnschichtchromatographie durchgeführt. Celluloseplatten ohne Fluoreszenzindikator hatten sich in Vorversuchen als das geeignetste Trägermaterial (stationäre Phase) für die Auftrennung von Histamin und verschiedener methylierter Histamine (s. 2.1.4.1.) erwiesen.

1,5 cm vom Unterrand der Dünnschichtplatte entfernt wurden unter Trocknung mit einem Föhn folgende Substanzen aufgetragen (von links nach rechts): 1) 50 μl ($\approx 0,5$ μg) Histamin oder N'-Methylhistamin oder N',N'-Dimethylhistamin; 2) 50 μl ($\approx 0,5$ μg) 1(τ)-Methylhistamin + 50 μl Extrakt (≈ 5415 dpm (s. oben) oder 0,5-0,8 μg 1(τ)-Methylhistamin); 3) 50 μl ($\approx 0,5$ μg) 1(τ)-Methylhistamin; 4) 50 μl Extrakt; 5) wie 3); 6) wie 2); 7) 50 μl ($\approx 0,5$ μg) 2-Methylhistamin oder 3(π)-Methylhistamin oder 5-Methylhistamin. Alle Substanzen waren in einem Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch (3:2; v/v) gelöst.

Zur aufsteigenden Chromatographie wurden die Platten in Chromatographietröge (Desaga, Heidelberg) gestellt, die mit Filterpapier (Whatmann No 1) ausgeschlagen waren. Die Tröge wurden 1 cm hoch mit einem Chloroform/Methanol/Wasser-Gemisch (60:35:5), das von 8 getesteten Laufmitteln für die Trennung von Histamin und methylierten Histaminen am geeignetsten war, gefüllt. Als Laufstrecke für die Lösungsmittelfront wurden 10 cm gewählt.

Nach Trocknung der Platten in Luftatmosphäre wurden sie zur Entwicklung entweder mit elementarem Jod bedampft oder mit 0,1%iger Ninhydrinlösung (Spray-Gun, Serva, Heidelberg) besprüht und 5 min auf 60°C erhitzt.

Die Nachweisgrenzen lagen für Histamin bei 100 ng, für 1(L)-Methylhistamin bei 200 ng und für die anderen methylierten Histamine um 500 ng (jeweils Dihydrochlorid).

Die aufgetragenen Substanzen wurden durch Vergleich der Rf-Werte nach Anfärben und durch Lokalisation der gebildeten Radioaktivität identifiziert. Für das letztere Verfahren wurde das Trägermaterial der Chromatographiebahnen 2, 4 und 6 vom Startpunkt bis zur Laufmittelfront fraktioniert ausgekratzt und die im Cellulosematerial enthaltene Radioaktivität durch direkte Messung des Trägermaterials in einem Szintillationsgemisch, das aus 2 ml Soluene 100, 4 ml Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch (3:2; v/v), 2 ml absolutem Äthanol und 10 ml Toluol-Szintillator (s. 2.2.1.1.) bestand, bestimmt.

2.2.3.2. Präparative Gewinnung von ^{14}C -1(L)-Methylhistamin

Zur präparativen Herstellung von ^{14}C -1(L)-Methylhistamin wurden 500 μl des Toluol/Isoamylalkohol-Gemisches auf Celluloseplatten (0,25 mm Beschichtung) aufgetragen. Die Durchführung der Chromatographie wurde wie unter 2.2.3.1. beschrieben vorgenommen. Folgende Substanzen wurden aufgetragen (von links nach rechts): 1) 50 μl des Extraktes (≈ 5145 dpm, s. oben);

2) 50 μ l ($\approx$ 0,5 μ g) 1(τ)-Methylhistamin; 3) 500 μ l des Extraktes ($\approx$ 51.450 dpm); 4) wie 2); 5) wie 1).

Beim Entwickeln des Chromatogramms durch Besprühen mit 0,1%iger Ninhydrinlösung wurde die mittlere präparative Zone (Chromatographiebahn 3) mit einer Glasplatte abgedeckt. Die Festlegung des Rf-Wertes des in der Präparation enthaltenen ^{14}C -1(τ)-Methylhistamins erfolgte durch das unmittelbar daneben aufgetragene und sichtbar gemachte authentische 1(τ)-Methylhistamin. An der entsprechenden Stelle wurde das Cellulosematerial abgekratzt (1,5 cm hoch, 2 cm breit) und das enthaltene ^{14}C -1(τ)-Methylhistamin mit 2 ml 0,1 N NaOH extrahiert und anschließend mit 0,2 ml 2 N HCl angesäuert. Diese 2,2 ml Lösung enthielten ca. 80% der aufgetragenen Radioaktivität.

Durch Zusatz von je 0,1 ml dieser Lösung zu Inkubationsansätzen (s. 3.1.1.4.) wurde die Ausbeute der Extraktion des 1(τ)-Methylhistamins in das Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch unter verschiedenen Bedingungen bestimmt.

2.2.4. Statistische Auswertungen

Zur Berechnung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Korrelationskoeffizienten, die vielfach angegeben wurden, sowie zur Bestimmung der statistischen Signifikanz nach dem Student t-Test (136) wurde ein Tischkomputer (Programma 102, Olivetti, Ivrea) verwendet.

3. Ergebnisse

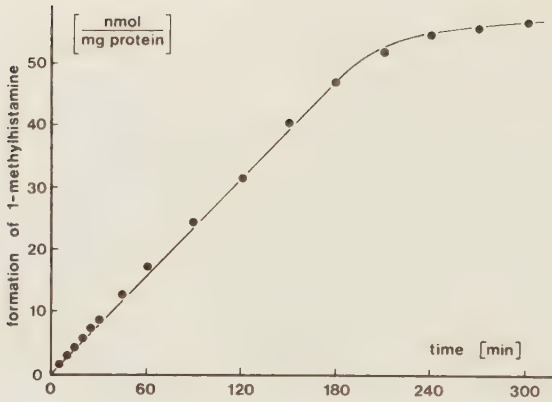
3.1. Methoden zur Bestimmung der Aktivität der HMT

3.1.1. Isotopenmethode mit S-Adenosyl-L-[methyl- ^{14}C]methionin

3.1.1.1. Reaktionskinetik

Unter den gewählten Inkubationsbedingungen (s. Tab. 5) nahm sowohl für Rohhomogenate als auch teilgereinigte Enzympräparationen die Menge gebildeten 1(τ)-Methylhistamins bis 180 min linear zu (Abb. 4). Der Umsatz war in einem Bereich von 38 - 650 μ g Enzympräparation/Ansatz der eingesetzten Menge Enzym proportional (Abb. 4).

a



b

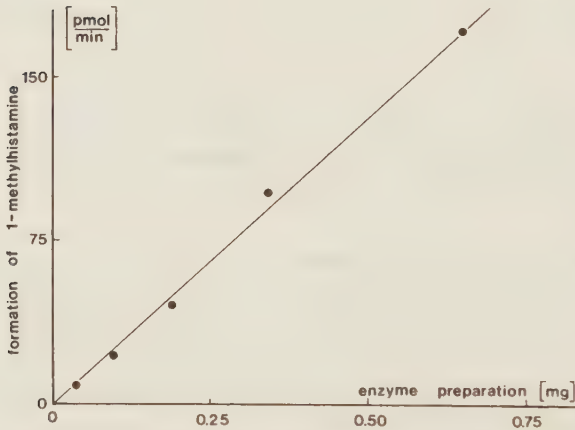


Abb. 4 Bildung von ^{14}C -1(U)-Methylhistamin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der eingesetzten Enzymmenge
Mittelwerte aus 3 Bestimmungen. Als Enzympräparation diente ein Rohhomogenat aus Schweineantrumucosa. In Teil (a) wurden pro Inkubationsansatz 1,33 mg Protein eingesetzt. Nach entsprechender Verdünnung erfolgte die Bestimmung des Proteingehalts in Teil (b) nach 2.2.2.2. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

Die Bildung von 1nmol 1(U)-Methylhistamin entsprach einer registrierten ^{14}C -Aktivität von 114 cpm (zur Bestimmung der

Extraktionsausbeute und des Wirkungsgrades der ^{14}C -Zählung s. auch 3.1.1.4.).

Da bei Rohhomogenaten die spezifischen Aktivitäten zwischen 20 und 600 pmol/(min x mg Protein) lagen (vgl. Tab. 10), und pro Inkubationsansatz ca. 1,0 mg Protein verwendet wurde, erhielt man nach einer Inkubationszeit von 60 min 300 - 4350 cpm bei einem Blankwert von 150 cpm. Die teilgereinigten Enzympräparate (s. 2.1.2.4.) zeigten eine spezifische Aktivität von 1,5 - 5,0 nmol/(min x mg Protein). Da pro Inkubationsansatz 30 - 70 μg Protein eingesetzt wurden, ergaben sich, wieder bei einem Blankwert von 150 cpm, 320 - 2600 cpm/60 min Inkubationszeit. Somit waren die Aktivitäten der verschiedenen Enzympräparationen gut meßbar.

3.1.1.2. Identifizierung von 1(τ)-Methylhistamin als Reaktionsprodukt der Methylierung

In Vorversuchen wurde aus 8 verschiedenen Laufmittelgemischen für die Dünnschichtchromatographie die Zusammensetzung Chloroform/Methanol/Wasser (60:35:5) ausgewählt. Dieses Gemisch führte zur besten Auftrennung der verschiedenen methylierten Histamine und von Histamin selbst. Folgende R_f -Werte wurden bei Cochromatographie erhalten: Histamin 0,63-0,65; 1(τ)-Methylhistamin 0,90-0,94; 2-Methylhistamin 0,77-0,79; 3(π)-Methylhistamin 0,81-0,86; 5-Methylhistamin 0,71-0,75; N'-Methylhistamin 0,80-0,84; N',N'-Dimethylhistamin 0,71-0,75.

Auch die aus dem Ansatz mit teilweise gereinigter HMT nach 240 min Inkubationszeit mit Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch extrahierte Radioaktivität wurde in 3 Experimenten der Dünnschichtchromatographie unterzogen. Es wurde nur ein mit Ninhydrin anfärbbarer Fleck mit einem R_f -Wert von 0,90-0,94 gefunden. Auch wurde im abgeschabten Trägermaterial ^{14}C -Aktivität nur im Bereich dieses Flecks erhalten, während die übrige Laufstrecke keine signifikante Radioaktivität aufwies. Damit erschien es gesichert, daß 1(τ)-Methylhistamin das eine Reaktionsprodukt der durch HMT katalysierten Reaktion darstellte.

3.1.1.3. Inkubationsbedingungen

Die optimalen Konzentrationen der Reaktionspartner für die Bestimmung der HMT-Aktivität sind in Tab. 5 angegeben.

Donorsubstrat: Konzentrationen des Co-Substrates S-Adenosyl-L-methionin unter $2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ergaben keine lineare Kinetik über 60 min (Abb. 5). Eine Hemmung durch SAM in hohen Konzentrationen wurde nicht beobachtet. Ein besonderes Problem bei der Optimierung der Inkubationsbedingungen bildete die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der verwendeten Charge des ^{14}C -SAM (Tab. 8). Es traten signifikante Unterschiede bis zu

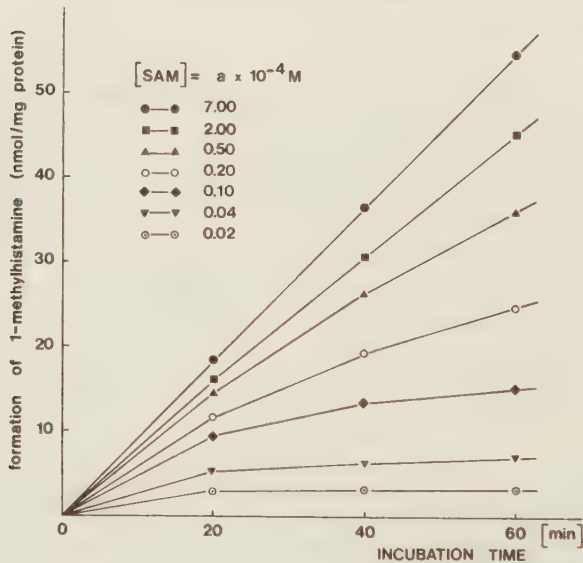


Abb. 5 Bildung von 1(Z)-Methylhistamin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der SAM-Konzentration

Mittelwerte aus 3 Bestimmungen. Der Proteingehalt des teilgereinigten Enzympräparates betrug 0,70 mg/ml, die Histaminkonzentration war 0,584 mM. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

Nr.	Firma	Charge	Deklarierte spez.Rad. [mCi/mmol]	Gesamtkonz. des SAM [mM]	spez. Akt. [$\frac{\text{pmol}}{\text{min} \times \text{mg Prot.}}$]	Abwei- chung [%]
1	AB	15	0,50	0,7	2620	-8
2	AB	17	0,50	0,7	2851	0
3	AB	17	0,50	0,5	2594	-9
4	AB	19	0,50	0,7	2179	-24
5	NEN	756	58,0	0,7	2858	0
6	NEN	797	57,1	0,7	2309	-19
7	NEN	797	57,1	0,5	2509	-12
8	NEN	823	56,7	0,7	2657	-7

Tab. 8 Abhängigkeit der HMT-Aktivität von der Verwendung ver-
schiedener ^{14}C -SAM-Chargen

Mittelwerte aus 4 Bestimmungen. Die höchste spezifische Aktivität = 100%. AB = Amersham-Buchler; NEN = New England Nuclear. Alle Versuche wurden mit der gleichen, teilgereinigten Enzympräparation durchgeführt. Die spezifische Radioaktivität im Gesamtansatz war in allen Fällen 0,143 mCi/mmol. Für alle Inkubationen wurde nicht-radioaktives SAM der gleichen Charge verwendet. Zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

maximal 24% bei den Enzymaktivitäten auf, sowohl nach Zugabe verschiedener Chargen derselben Firma als auch nach Zugabe von SAM verschiedener Firmen. Da diese Unterschiede bei einer SAM-Konzentration von 350 nmol/Ansatz (Tab. 8, vgl. Nr. 2 und 6) geringer waren als bei 250 nmol/Ansatz (Tab. 8, vgl. Nr. 3 und 7), sind Verunreinigungen im kalten SAM wie z.B. SAH möglicherweise die Hauptursache dieser Varianzen. Auf Grund dieser Schwankungen in der Bestimmung der HMT-Aktivität wurde eine Qualitätskontrolle durchgeführt (Variationskoeffizienten s. 3.1.1.5.), indem in Parallelansätzen jeden Tag die Aktivität eines Enzympools mitgemessen und wichtige Vergleichsbestimmungen an ein und demselben Tag durchgeführt wurden.

Akzeptorsubstrat: Die Konzentrationen von Histamin, die unter

$1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ lagen, wie z.B. bei der Methode nach (137), ergaben keine maximal mögliche Anfangsgeschwindigkeit. Höhere Konzentrationen von Histamin hemmten das Enzym (Abb. 6).

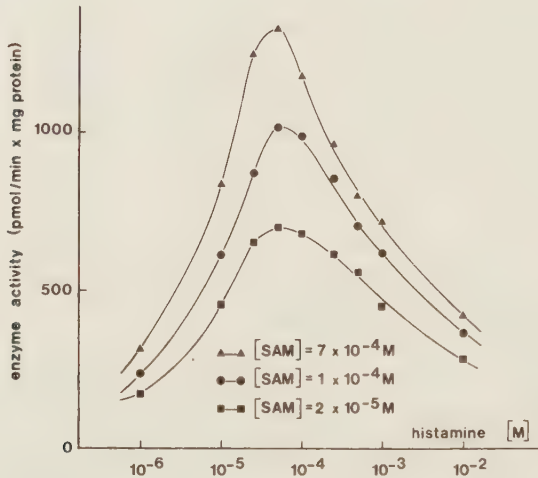


Abb. 6 Substrathemmung der HMT durch steigende Konzentration von Histamin bei verschiedenen SAM-Konzentrationen

Mittelwerte aus 3 Bestimmungen. Der Proteingehalt des teilgereinigten Enzympräparates betrug $0,70 \text{ mg/ml}$. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

So wurde eine 50%ige Hemmung bereits bei einer Histaminkonzentration von $3,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ erreicht. Im untersuchten Konzentrationsbereich war die optimale Histaminkonzentration unabhängig von der verwendeten Konzentration an SAM (Abb. 6). Eine Beeinflussung der Enzymaktivität durch verschiedene Chargen von Histamin wurde nicht beobachtet. Das verwendete Histamin war im Dünnschichtchromatogramm in allen untersuchten Fällen frei von Ninhydrin-positiven Reagenzien (s. auch 2.2.3.1).

und 3.1.2.2.)). Eine Zugabe von Nicotinamid und/oder Aminoguanidinsulfat war bei der radioaktiven Bestimmung der HMT-Aktivität nicht nötig. Beide Inhibitoren hemmen die im Magen vorkommenden geringen Aktivitäten der Aminoxidase (Pyridoxal-phosphat enthaltend) (EC 1.4.3.6) oder NAD(P)⁺-Nucleosidase (EC 3.2.2.6). Da aber bei einer geringen Abnahme der Histamin-konzentration durch diese Enzyme die hohen Substratkonzentrationen auf jeden Fall für eine optimale Aktivität des Enzyms ausreichten, wurde diese damit weitgehend unabhängig von der Substratkonzentration.

Verschiedene anorganische Ionen: Die Zugabe verschiedener Kationen und Anionen, wie Na⁺, K⁺, Cl⁻, J⁻ und SO₄²⁻, hatte bis zu einer Konzentration von 0,1 M keinen Einfluß auf die Enzymaktivität (s. auch 3.5.4.6.). Damit störten sämtliche durch die Substrate oder die Enzymlösung eingebrachten Anionen oder Salze (kochsalzhaltige Enzympräparation nach 2.1.2.4.!) den Enzymtest nicht.

Enzympräparate: Wurde zu den Rohhomogenaten Triton X 100 in 2-10%iger Endkonzentration oder zu den Inkubationsgemischen mit Rohhomogenat in 1%iger Endkonzentration zugesetzt, so ergab sich eine durchschnittliche Erhöhung der Enzymaktivität um 19% (n=5).

Eine solche Erhöhung der Enzymaktivität bis zu 28% (n=3) konnte auch festgestellt werden, wenn vor der Inkubation das radioaktive SAM mit dem Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch gewaschen wurde, um evtl. vorhandene radioaktive Verunreinigungen zu entfernen. Durch diesen Reinigungsschritt gelangten Spuren von Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch in die Inkubationsansätze, die, wie Kontrollversuche mit Zusatz von 50-100 µl Toluol/Inkubationsansatz zeigten, sehr wahrscheinlich diese Erhöhung der Enzymaktivität bewirkten.

Vorinkubation: Bei Hemmstoffversuchen wurde der Inhibitor 30 min mit Histamin, NaPP und dem Enzym vorinkubiert. Unter diesen Bedingungen wirkte Amodiachin in Konzentrationen unter $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 20% stärker als ohne Vorinkubation. Im Gegensatz

hierzu war die Stärke der Enzymhemmung durch SAH unabhängig von der Vorinkubation irgendeines Teilgemisches aus dem Inkubationsansatz mit dem Inhibitor (Tab. 9).

Diese Tabelle zeigt auch, daß in Inkubationen ohne Hemmstoff die Reihenfolge der Zugabe der Substrate und der Enzympräparation zum Inkubationsgemisch ohne Bedeutung ist.

Vorinkubation	Inkubation	SAH-Zugabe $[10^{-4}M]$		Abnahme der HMT-Akt. [%]
		zur Vorinku- bation	zur Inku- bation	
Enzym	SAM + Histamin	-	-	0
		+	-	55
		-	+	53
Enzym + SAM	Histamin	-	-	0
		+	-	52
		-	+	51
Enzym + Histamin	SAM	-	-	0
		+	-	57
		-	+	55
SAM + Histamin	Enzym	-	-	0
		+	-	56
		-	+	53
SAM	Enzym + Histamin	-	-	0
		+	-	51
		-	+	53
Histamin	Enzym + SAM	-	-	0
		+	-	56
		-	+	54

Tab. 9 Einfluß der Vorinkubation eines Teiles des Inkubationsansatzes mit oder ohne SAH auf die HMT-Aktivität

Mittelwerte aus 4 Bestimmungen. Die Vorinkubationen wurden 30 min bei $37^{\circ}C$ durchgeführt. $[SAM] = 1,0 \times 10^{-4}M$. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

3.1.1.4. Extraktionsbedingungen und Zählausbeuten

Extraktionsmedium und Gesamtausbeute an 1(τ)-Methylhistamin:

Für das Extraktionsmedium wurde ein Gemisch von Isoamylalkohol/Toluol im Verhältnis 2:3 (v/v) gewählt. Dieses Gemisch ergab eine um 4,9% (n=4) signifikant höhere Zählausbeute als ein 1:1 (v/v) und eine um 15,7% (n=4) höhere Zählausbeute als ein 1:4 (v/v) Gemisch. Mit diesem Extraktionsmedium betrugen die Ausbeuten von zugesetztem ^{14}C -1(τ)-Methylhistamin (≈ 1870 dpm; Präparation s. 2.2.3.2.), das Ansätzen ohne markiertem SAM zugesetzt wurde, $61 \pm 3\%$. Damit wurde eine beachtliche Präzision für diesen Schritt der Methode erreicht. Auch in Experimenten von Tag zu Tag schwankte die Gesamtausbeute nur um $\pm 3,5\%$. Im folgenden wurden deshalb auch die nach Inkubation mit dem Enzym und Extraktion erhaltenen cpm-Werte mit Hilfe dieses Gesamtausbeutefaktors von 60% in pmol 1(τ)-Methylhistamin umgerechnet. Damit ließ sich die Enzymaktivität in pmol/(min x mg Protein) angeben.

Extraktion von anderen radioaktiven Verbindungen als

1(τ)-Methylhistamin: Unter den gewählten Extraktionsbedingungen wurden weniger als 0,05% der durch S-Adenosyl-L-[methyl- ^{14}C]methionin eingebrachten Radioaktivität in die organische Phase extrahiert, die nicht mit 1(τ)-Methylhistamin identisch war (0,05% $\approx$ ca. 180 cpm). Wurde die Extraktion bei pH < 3,0 durchgeführt, erhöhte sich diese Extraktion auf 1,8%, unabhängig davon, ob S-Adenosyl-L-[methyl- ^{14}C]methionin oder S-Adenosyl-L-[carboxyl- ^{14}C]methionin verwendet wurde.

Durch schrittweises Verdünnen oder Weglassen aller anderen Inkubationspartner wurde gezeigt, daß die Extraktion anderer radioaktiver Substanzen als 1(τ)-Methylhistamin auf das radioaktive SAM zurückzuführen war. Auch einmaliges Waschen des SAM mit Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch vor dem Einsetzen in die Inkubation konnte die Leerwerte nicht senken, ebenso wenig ein nochmaliges Waschen des Toluol/Isoamylalkohol-Ge-

misches nach der Inkubation mit 1 ml 0,5 M Boratpuffer, pH 10,0. Vielmehr gehen bei diesem Waschgang fast 50% des bereits extrahierten 1(Σ)-Methylhistamins verloren.

Bei Inkubationsansätzen mit einem pH-Wert über pH 7,4 nahm die Extraktion unspezifischer Radioaktivität stark zu. SAM wird im schwach alkalischen Milieu zeitabhängig zu 5'-Methylthioadenosin und Homoserin hydrolysiert (11, 135, 130). Außerdem stieg in den Leerwerten mit durch Hitze inaktiviertem als auch mit alkaliinaktiviertem Enzym bei 37°C die unspezifische Radioaktivität auf das 4-6fache an. Die Extraktion von anderen radioaktiven Verbindungen als 1(Σ)-Methylhistamin aus dem Enzymansatz stellt einen der limitierenden Faktoren für die Empfindlichkeit der HMT-Aktivitätsbestimmung mittels des Isotopentestes dar. Dieses Problem spielt bisher bei der Bestimmung der Enzymaktivität im Gewebe keine Rolle, wohl aber bei der Bestimmung von äußerst geringen Mengen von Histamin (141, 81).

Zusammensetzung des Szintillationsgemisches und Wirkungsgrad:

Die im Szintillationsgemisch enthaltene Radioaktivität wurde mit dem im Szintillationszähler vorgegebenen ^{14}C -Kanal gemessen. Der Wirkungsgrad der Zählausbeute wurde durch mehrere abgestoppte Nullwerte, denen als interner Standard verschiedene bekannte Mengen (0,01-0,05 ml $\hat{=}$ 7760-38.800 dpm) ^{14}C -Toluol entweder unmittelbar nach der Inkubation oder nach der Zentrifugation zugegeben worden waren, bestimmt. Der Variationskoeffizient variierte bei diesen Bedingungen außerordentlich wenig und betrug für 0,05 ml Toluol und Zugabe unmittelbar nach Inkubation 83,4% (n=21, VC=3,4%). Damit war der Quench sehr gleichmäßig und geringfügig. Eine weitere Quenchkontrolle wurde durch Ermittlung des externen Standard-Kanal-Verhältnisses mittels eines hochenergetischen externen Standards durchgeführt. Auch dieser Test sprach für einen gleichmäßigen und geringfügigen Quench der Proben.

Der Zusatz des Äthanol zum Szintillationsgemisch erniedrigte den Wirkungsgrad nur geringfügig, konnte aber den durch die

Zugabe des Toluol/Isoamylalkohol-Gemisches erzeugten Abfall des Wirkungsgrades auf 82-83% beschränken. Diese Werte für den Wirkungsgrad waren unabhängig vom verwendeten Flaschenmaterial (Polyäthylen oder Glas) und unabhängig vom Material verschiedener Hersteller (Fa. Hormuth, Heidelberg oder Fa. Packard, Frankfurt). Die Zählflasche blieb bis zu 4 Tagen konstant.

3.1.1.5. Präzisionskontrolle der Isotopenmethode

Der Variationskoeffizient für die nach der Isotopenmethode bestimmten HMT-Aktivitäten betrug sowohl unter Verwendung von Rohextrakten als auch von teilgereinigten Enzympräparaten 3,8% (n=12). Wurde die Enzymaktivität von Proben einer teilgereinigten Enzympräparation über einen Zeitraum von 3 Wochen hinweg jeden 4. Tag bestimmt, so ergab sich ein durchschnittlicher Variationskoeffizient für die von Tag-zu Tag-Bestimmung von nur 4,9% (n=5), wobei bereits die zur spezifischen Aktivitätsbestimmung benötigte Proteinbestimmung nach Lowry et al. (110) mit einem Variationskoeffizienten von 4,0% (n=7) behaftet war. Wurde der Variationskoeffizient unter Verwendung verschiedener Konzentrationen eines Rohenzympräparates bestimmt (Konzentration des Proteingehalts zwischen 1,140 und 0,055 mg pro Inkubationsansatz) so war er 4,5% (n=5). Bei Zusatz von Inhibitoren, wie Amodiachin und 1(7)-Methylhistamin, in einer Konzentration, die eine 50%ige Hemmung der HMT bewirkten, betrug der Variationskoeffizient 5,0% (n=21). Damit erwies sich die Isotopenmethode zur Bestimmung der HMT-Aktivität als ein Test von beachtlich guter Präzision.

3.1.2. Fluorometrische Methode mit Bestimmung von Histamin

3.1.2.1. Reaktionskinetik

In Gegenwart von SAM wurde Histamin in den Inkubationsgemischen mit Rohextrakten aus Meerschweinchenhirn 30 bis 50 min lang mit einer konstanten Geschwindigkeit abgebaut (vgl. 25). Bei dem Enzym aus der Magenschleimhaut von Mensch, Hund

und Schwein betrug dieser Zeitraum zwischen 15 und 30 min. Da die Zeitdauer eines linearen Histaminabbaus auch bei gleicher Enzymquelle in den einzelnen Versuchen variierte, erwies es sich als notwendig, die Reaktionskinetik bei jeder HMT-Aktivitätsbestimmung zu verfolgen.

Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit war nicht auf eine Verarmung an Histamin oder SAM im Ansatz zurückzuführen, da sie, nachdem die Anfangsgeschwindigkeit abgenommen hatte, nicht durch die Zugabe eines der beiden Substrate verhindert werden konnte.

3.1.2.2. Spezifische Bestimmung von Histamin als das Substrat der durch die HMT katalysierten Methylierung

Die Identifizierung der Substanz, die durch Ionenaustauschchromatographie aus den Inkubationsansätzen isoliert und als Histamin angesehen wurde, erfolgte - wie bei (100) beschrieben - durch 3 verschiedene Methoden: Die mit der fluorometrischen Bestimmung erhaltenen Ergebnisse wurden mit den Histaminwerten verglichen, welche durch die biologische Bestimmung des Amins am isolierten Meerschweinchenileum oder am systemischen Blutdruck der narkotisierten Katze ermittelt worden waren. Weiterhin wurden die Anregungs- und Fluoreszenzspektren, sowie nach Dünnschichtchromatographie in 8 Laufmitteln (Laufmittel s. bei (100)), die Rf-Werte der isolierten Substanz mit der von authentischem Histamin verglichen. Alle diese und weitere Identifizierungsmethoden (101) ergaben übereinstimmend, daß die aus den Inkubationsgemischen isolierte, mit der Inkubationsdauer in ihrer Konzentration fortschreitend abnehmende und mit o-Phthaldialdehyd einen fluoreszierenden Komplex ergebende Substanz Histamin war.

3.1.2.3. Inkubationsbedingungen

Die optimalen Bedingungen für die Bestimmung der HMT-Aktivität sind in Tab. 7 angegeben. Sie wurden durch Variation jedes einzelnen Parameters bei Konstanthalten der übrigen Meßgrößen ermittelt (100).

Histaminkonzentration: Die von anderen Autoren zu einer fluorometrischen Enzymaktivitätsbestimmung verwendeten Histaminkonzentrationen waren weit unter der Substratsättigung, z.B. $1,35 \times 10^{-5} \text{M}$ (117). In der Magenschleimhaut, in der das Enzym in dieser Arbeit untersucht werden sollte, waren die Konzentrationen von endogenem Histamin relativ hoch (ca. 10^{-4}mol/kg Gewebe, entsprechend ca. $2,5 \times 10^{-5} \text{M}$ im Ansatz (104)) und variierten ganz erheblich. Somit waren die üblicherweise verwendeten geringen Substratmengen für die quantitative Bestimmung der HMT-Aktivität absolut ungeeignet. Deshalb wurden Histaminkonzentrationen verwendet, die im Bereich des Substratoptimums lagen ($0,8\text{--}1,2 \times 10^{-4} \text{M}$, vgl. hierzu 3.1.1.3.). In diesem Bereich war die Reaktionsgeschwindigkeit sicher unabhängig von der Substratkonzentration und damit von einer variablen Konzentration an endogenem Histamin.

Hemmung der Aminoxidase und der NAD(P)^+ -Nucleosidase: Histamin wird im Gewebe nicht nur durch HMT, sondern auch durch Aminoxidase (Pyridoxalphosphat enthaltend) (EC 1.4.3.6), NAD(P)^+ -Nucleosidase (EC 3.2.2.6), Histaminacetyltransferase (EC 2.3.1) und Histaminaminotransferase (EC 2.6.1) inaktiviert (93).

Von diesen Enzymen konnten nur sehr geringe Mengen Aminoxidase-Aktivität in der Magenschleimhaut nachgewiesen werden (83). Deshalb wurde Aminoguanidin, das ein guter Hemmstoff dieses Enzyms ist (83) in $1,0 \times 10^{-4} \text{M}$ Konzentration zu den Inkubationsgemischen zugesetzt. Auch in Gegenwart dieses Hemmstoffes konnte ein Verschwinden des Histamins in den Reaktionsgemischen, die kein exogenes SAM enthielten, beobachtet werden. Die Verschwindensrate des Histamins wuchs linear mit der Inkubationszeit und machte bei den Inkubationsgemischen mit Schweineantrumucosa ($n=9$) 10% des Abbaus in Gegenwart von SAM aus ($34 \pm 8 \text{ pmol}/(\text{min} \times \text{mg Protein})$). Da dieser Abbau durch die Zugabe von Perchlorsäure vor der Inkubation vollkommen aufgehoben werden konnte, wurde angenommen,

daß noch weitere enzymatische Reaktionen für diese Abnahme des Histamins in den Inkubationsgemischen verantwortlich waren.

Da in ungefähr 80% der Inkubationen ($n \sim 500$) das Abnehmen der Histaminkonzentration durch $1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$ Nicotinamid, einem Inhibitor der NAD(P)^+ -Nucleosidase (93) verhindert werden konnte, war dieses Verschwinden des Substrates in der Abwesenheit von exogenem SAM der Wirkung dieses Enzyms zuzuschreiben.

In den restlichen 20% der Inkubationen könnten andere Enzyme wie Histaminacetyltransferase oder Histaminaminotransferase für das Verschwinden von Histamin verantwortlich gewesen sein. Über das Vorkommen in der Magenschleimhaut oder über Inhibitoren dieser Enzyme ist nichts bekannt. Deshalb schien es für die quantitative Bestimmung der HMT-Aktivität notwendig (1) Nicotinamid und Aminoguanidin zu den Inkubationsgemischen zuzusetzen und (2) wenigstens je drei Reaktionsgemische mit und ohne die Zugabe von SAM zu inkubieren. Eine Hemmung der HMT durch $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ Aminoguanidinsulfat oder $1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$ Nicotinamid konnte nicht festgestellt werden.

Optimaler pH-Bereich: Der optimale pH-Bereich der Reaktion war ohne ausgeprägten Gipfel (7,2 - 8,0). Da der höchste Histaminsatz bei pH 7,4 zu beobachten war und auch bei diesem pH-Wert die Hydrolyse des SAM am geringsten war (s. 3.1.1.4.), wurde dieser pH-Wert für die Inkubationen mit beiden Methoden (Isotopenmessung und Fluorometrie) verwendet. Für die übrigen Inkubationsbedingungen beim fluorometrischen Test gelten dieselben Ausführungen, wie sie bereits für die Isotopenmethode beschrieben wurden.

3.1.2.4. Ausbeute und Präzisionskontrolle der fluorometrischen Methode

Die Ausbeute des zu den Inkubationsansätzen nach Abstoppen der Reaktion mit Perchlorsäure zugesetzten Histamins war 95-100%, der Variationskoeffizient der Histaminbestimmung 4,2% ($n=18$).

Der Variationskoeffizient für die nach der fluorometrischen Methode bestimmte HMT-Aktivität betrug für das Rohenzym aus der Antrumschleimhaut des Schweines bei Einzelwerten 19,8% (n=11), bei 3 Bestimmungen zu verschiedenen Inkubationszeiten aber nur 8%. Die Verwendung von 3 Ansätzen mit und ohne SAM-Zusatz zur Aktivitätsbestimmung der HMT ergibt sich damit aus zwei Gründen: Durch Erfassung eines nicht HMT-bedingten Histaminumsatzes wurde die Richtigkeit des Enzymtestes erhöht. Außerdem wurde die Präzision unter einen Variationskoeffizienten von 10% gebracht und somit das Kriterium eines qualitätskontrollierten Enzymtests erfüllt (16).

3.1.3. Richtigkeit der Proteinbestimmung

Die Richtigkeit der Bestimmung der spezifischen HMT-Aktivität hängt in dem verwendeten Bezugssystem von der Richtigkeit der Bestimmung des Proteingehalts der Enzymlösung ab. Deshalb wurden 3 Proteinbestimmungsmethoden miteinander verglichen: Biuretmethode (156), Lowry-Methode (110) sowie die Methode nach Warburg und Christian (151).

Bei allen Proteinbestimmungen in Homogenaten aus Magenschleimhautgewebe zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Lowry-Methode mit der Biuretmethode. Der Quotient Protein (Lowry)/Protein (Biuret) ergab einen Wert von 1,01, der Korrelationskoeffizient war 0,98 (n=50). Auch der Vergleich der Proteinbestimmung nach Warburg und Christian und der nach der Biuretmethode ergab eine gute Übereinstimmung. So war der Quotient Protein (Warburg und Christian)/Protein (Biuret) 1,09 (Korrelationskoeffizient 0,97, n=23). Dieser Quotient stieg für Proteinwerte unter 0,5 mg/ml wegen der Unempfindlichkeit der Biuretmethode in diesem Bereich stark an.

3.1.4. Vergleich der Isotopenmethode mit der fluorometrischen Methode zur Bestimmung der HMT-Aktivität

Die Bestimmung der HMT-Aktivität aus 6 verschiedenen Rohhomogenaten aus Schweinemagenmucosa nach den beiden oben be-

schriebenen Methoden ergab eine sehr gute Übereinstimmung (Abb. 7). Der Korrelationskoeffizient für die Werte beider Verfahren war $r=0,995$, der Schnittpunkt mit der y-Achse lag bei $-4,81$ und war damit nicht signifikant von 0 verschieden.

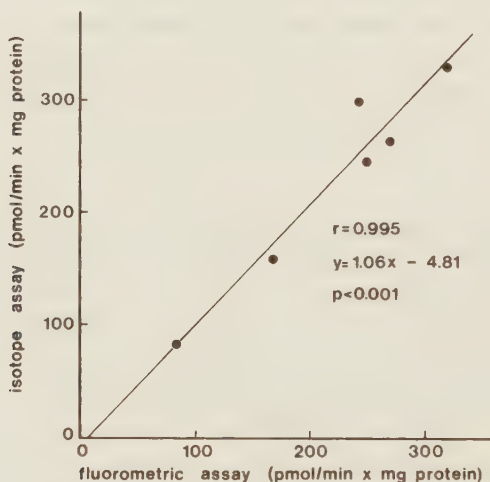


Abb. 7 Korrelation der nach der Isotopen- und der fluorometrischen Methode bestimmten Werte für die HMT-Aktivität

Die Enzymaktivitäten wurden aus 4 Antrum- und 2 Corpus-schleimhäuten des Schweines bestimmt. Die Werte für die fluorometrische und die Isotopenmethode sind jeweils Mittelwerte aus 3 bzw. 4 Aktivitätsbestimmungen nach verschiedenen Inkubationszeiten. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1. und 2.2.1.2.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der HMT im Magengewebe in einem Bereich von 50-350pmol/(min x mg Protein) konnte demnach mit beiden Methoden prinzipiell durchgeführt werden. Außerdem entsprach der Umsatz des Histamins stöchiometrisch

der Bildung von 1(τ)-Methylhistamin. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen fand also kein die Methode störender Abbau von Histamin und keine unabhängig von der Histaminmethylierung erfolgende Bildung von 1(τ)-Methylhistamin, wie z.B. durch Decarboxylierung von 1(τ)-Methylhistidin (132) statt.

Der Vorteil der Isotopenmethode gegenüber dem fluorometrischen Test besteht in ihrer größeren Empfindlichkeit bei der Bestimmung der Enzymaktivität, in größerer Bequemlichkeit und in besserer Präzision.

Der Vorteil der fluorometrischen Methode gegenüber der Isotopenmethode besteht in ihrer größeren Nachweisempfindlichkeit für das Substrat Histamin. Bei Identifizierungsversuchen für Histamin in Geweben und Körperflüssigkeiten, bei denen nur Nanogramm-Mengen des Substrats im Ansatz vorhanden waren, konnte nur mit dieser Methode der Histaminabbau verfolgt werden (98, 99, 101, 102, 103, 105, 106, 107, 108).

3.2. Vorkommen und Verteilung der HMT in der Magenschleimhaut von Mensch, Hund und Schwein

In der Magenschleimhaut des Menschen, des Hundes und des Schweines konnten, verglichen mit anderen Organen (25), hohe Aktivitäten der HMT festgestellt werden (Tab. 10). Die höchsten Werte wurden in der Antrumschleimhaut des Schweines gemessen. Auffallend war die signifikant niedrigere Aktivität der HMT im Corpusbereich (verglichen mit der im Fundus) bei Mensch und Schwein, während in allen drei Spezies die Aktivität im Antrum stark anstieg. In 7 menschlichen Magenschleimhäuten war selbst von der Corpus-Antrum-Grenze bis zum pylorusnahen Antrum hin ein Sprung in der Aktivität von 166 ± 42 auf 275 ± 86 pmol/(min $\times$ mg Protein) mit einer Signifikanz von $p < 0,025$ zu verzeichnen.

3.3. Beziehung zwischen der HMT-Aktivität und dem Histamingehalt in der Magenschleimhaut von Mensch, Hund und Schwein

Zur Klärung der Frage, ob die HMT-Aktivität mit dem Histamin-

Schleimhaut- abschnitt	n	Enzymaktivität [$\frac{\text{pmol}}{\text{min} \times \text{mg Protein}}$]	Extremwerte	Signifikanz
Mensch				
Fundus (F)	6	135 $\pm$ 53	74 - 228	$P_{F/C} < 0,005$
Corpus (C)	12	66 $\pm$ 30	21 - 117	$P_{C/A} < 0,001$
Antrum (A)	12	256 $\pm$ 103	124 - 468	$P_{F/A} < 0,020$
Hund				
Fundus (F)	8	247 $\pm$ 76	134 - 356	$P_{F/C}$ n.s.
Corpus (C)	8	257 $\pm$ 82	98 - 353	$P_{C/A} < 0,001$
Antrum (A)	8	397 $\pm$ 101	245 - 574	$P_{F/A} < 0,005$
Schwein				
Fundus (F)	8	285 $\pm$ 117	156 - 456	$P_{F/C} < 0,1$
Corpus (C)	8	186 $\pm$ 80	104 - 334	$P_{C/A} < 0,001$
Antrum (A)	28	413 $\pm$ 93	250 - 590	$P_{F/A} < 0,005$

Tab. 10 HMT-Aktivität in der Magenschleimhaut des Menschen, des Hundes und des Schweines

Die Bestimmung der Enzymaktivität ($\bar{x} \pm$ S.D.) erfolgte mittels der fluorometrischen Methode. Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.2.

gehalt des jeweiligen Organs korrelierte, wurde beim Menschen das untersuchte Material während Operationen aus verschiedenen Teilen des Magens entnommen, bei Hunden und Schweinen der ganze Magen entlang der Zirkulärmuskulatur in streifenförmige Stücke von 3-5 cm unterteilt. Bei allen 3 Spezies fällt die Enzymaktivität vom Fundus zum Corpus ab und steigt zum Pylorus hin wieder an (Abb. 8). Der Histamingehalt nimmt beim Menschen vom Fundus über den Corpus zum Antrum hin ab und ist auch bei Hund und Schwein im Corpusbereich am höchsten.

Damit besteht zwischen der Höhe des Histamingehalts und der HMT-Aktivität in diesen Einzelmägen keine direkte, sondern

eher eine gegenläufige Korrelation. Daraus kann man schließen, daß die HMT nicht, oder zumindest nicht ausschließlich, in Mastzellen lokalisiert ist, wie es von Histamin und der Histidindecaboxylase (EC 4.1.1.22) bekannt ist (62, 94, 95, 96, 97).

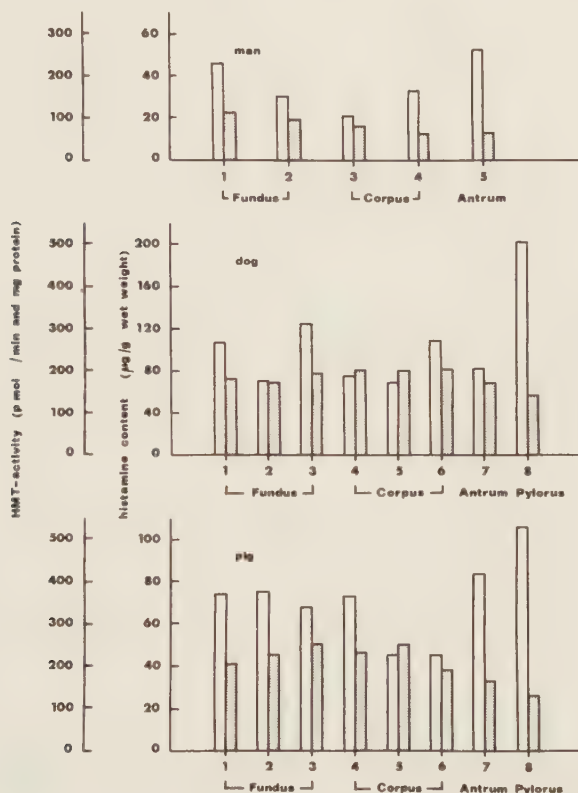


Abb. 8 Regionale Verteilung der HMT-Aktivität und von Histamin in der Magenschleimhaut von Mensch, Hund und Schwein

□ HMT-Aktivität; ■ Histamingehalt. Mittelwerte aus jeweils 2 Magenpräparationen. Fluorometrische Methode für die Histamin- und HMT-Aktivitätsbestimmung. Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.2.

3.4. Anreicherung der HMT aus der Antrumschleimhaut des Schweines

3.4.1. Verfahren zur bisher höchsten Anreicherung der HMT aus Schweineantrumschleimhaut

HMT aus Meerschweinchenhirn ist ein lösliches Enzym und nicht an subzelluläre Partikel gebunden (25). Auch aus Schweineantrumschleimhaut konnte durch Ultrazentrifugation ein lösliches Enzym gewonnen werden, das durch Ammonsulfatfällung, Chromatographie an DEAE-Cellulose und Gelfiltration an Sephadex G 100 angereichert wurde (s. 2.1.2.3). Tab. 11 gibt die Ergebnisse für einen Anreicherungsang des Enzyms wieder, Abb. 9a ein Elutionsdiagramm von einer DEAE-Säule bei kontinuierlichem Salzgradienten (s. 2.1.2.3) und Abb. 9b bei diskontinuierlichem Salzgradienten (s. 2.1.2.4.).

Behandlung	Protein [mg/ml]	Spez. Aktivität $\left[\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{mg Protein}} \right]$	Reini- gung	Ges. Akt. [nmol/min]	Aus- beute [%]
Homogenisation	13,0	0,16	1	6800	100
Ultrazentrifu- gation (143.000 g, 45 min)	10,8	0,40	2,5	6800	100
Ammonsulfat- fällung (60-80%)	4,2	0,57	4	1280	19
DEAE-Cellulose- Chromatographie (NaCl-Gradient, pH 7,4)	0,42	4,96	34	915	14
Sephadex G100 Gelfiltration (pH 7,4)	0,31	18,35	126	910	13

Tab. 11 Anreicherung der HMT aus Schweineantrummucosa

Einzelwerte von einem Enzympräparat, dessen Gewinnung unter 2.1.2.3. beschrieben wurde.

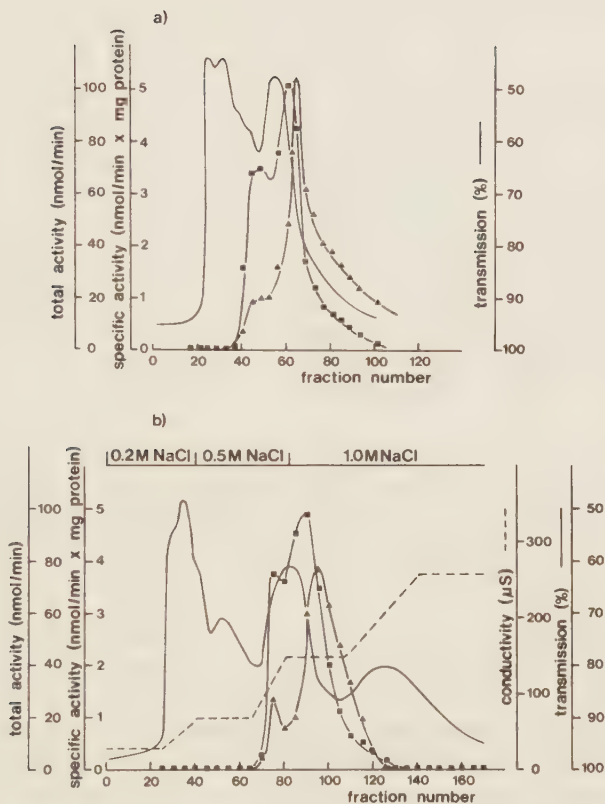


Abb. 9 Elutionsdiagramme für die Anreicherung der HMT an
DEAE-Cellulose

▲ — ▲ Spezifische Aktivität; ■ — ■ Gesamtaktivität.

Teil a: Elution mittels eines kontinuierlichen NaCl-Gradienten. Endkonzentration an Kochsalz 2,0 M.

Teil b: Elution mittels eines diskontinuierlichen NaCl-Gradienten.

Der Elutionspuffer war in allen Fällen 0,01 M NaPP, pH 7,4.

3.4.2. Auswirkung von Zentrifugation, Dialyse und Lyophilisation auf die Enzymaktivität

Bei allen durchgeführten Zentrifugationsverfahren (Tab. 12) fand sich die gesamte Enzymaktivität im Überstand. Die spezifische Aktivität war nach Ultrazentrifugation bei 143.000 g am höchsten. Sie wurde durch Zentrifugieren bei 600.000 g für 6 Stunden (68.000 Upm, Rotor 75 Ti, Beckman, München) nochmals um das 1,5-2fache gesteigert, doch fanden sich bereits 20% der Gesamtaktivität im Niederschlag. Aus diesem Grund und vor allem wegen der kleinen Volumina, die mit diesem Rotor nur zentrifugiert werden konnten, wurde als Standardverfahren die 45 min Zentrifugation bei 143.000 g im 60 Ti-Rotor beibehalten.

Zentrifugationsverfahren [mittlere Beschleunigung, Zeit]	Spezifische Aktivität [pmol/(min x mg Protein)]
370 g, 30 min	204
2.300 g, 30 min	256
36.900 g, 30 min	260
143.000 g, 45 min	316

Tab. 12 Einfluß verschiedener Zentrifugationsverfahren auf die HMT-Aktivität im Überstand eines Schweinemagenhomogenates

Mittelwerte aus 4 Bestimmungen. Alle Verfahren wurden bei 0-2 °C mit Rohhomogenaten wie unter 2.1.2.1. beschrieben durchgeführt. Zur Bestimmung der Aktivität s. 2.2.1.1.

Die Enzymaktivität im Eluat von DEAE-Säulen nahm bei Dialyse gegen 0,01 M NaPP, pH 7,4 bzw. pH 6,5, nach 3 Stunden um 25%, nach 5 Stunden um 50% und nach 12 Stunden um 80% (n=5) ab. Durch Zusatz von Glutathion in 10^{-3} M Konzentration zum Dialysemedium konnte der Verlust auf 55% beschränkt werden. Da jedoch die Enzymlösungen über Sephadex G 25 ohne Aktivitäts-

verlust entsalzt werden konnten, wurden keine weiteren Versuche zur Minderung des Aktivitätsverlustes bei Dialyse unternommen.

Durch Lyophilisieren trat bei Enzympräparationen, die durch Ultrazentrifugation und Filtration an Sephadex G 25 gewonnen wurden, kein Aktivitätsverlust auf. Wurde dagegen das Enzympräparat unmittelbar nach Chromatographie an DEAE-Cellulose (das Verbleiben des Kochsalzes im Eluat störte das Einfrieren für die Lyophilisation nicht) oder nach Chromatographie an DEAE-Cellulose und nachfolgendem Entsalzen an Sephadex G 25 lyophilisiert, so verlor es 45% an Gesamtaktivität (n=6). Auch die nach Dialyse noch vorhandene Restaktivität von 20% (s. oben) nahm durch Lyophilisieren noch einmal um die Hälfte ab (n=4).

3.4.3. Anreicherung der HMT durch Anwendung einiger Grobreinigungsverfahren

Alle die im folgenden beschriebenen Verfahren wurden bei 0-2°C durchgeführt.

Fraktionierte Fällung von Protein durch Ammoniumsulfat: Brown et al. (25) beschrieben für die Isolierung der HMT aus Meerschweinchenhirn die Fällung von Fremdprotein durch 45% und 70% Ammoniumsulfat als einen günstigen Reinigungsschritt. Dieses Verfahren war nur für die Anreicherung dieses Enzyms aus Meerschweinchenhirn reproduzierbar (s. 2.1.2.2.). Für Schweinemagen wurden die Fraktionierungsgrenzen bei 60% und 80% Sättigung gewählt. Die durchschnittliche Anreicherung betrug 1,5fach (n=7). Die Zugabe von 0,1 N Natronlauge, um während der Ammoniumsulfatfällung einen pH-Wert von 7,0-7,2 zu erhalten, verbesserte dieses Ergebnis nicht. Die geringe Anreicherung ging vor allem auf die hohen Verluste an Gesamtaktivität zurück, da bereits bei 30%iger Sättigung ein Verlust von 70% der Gesamtaktivität auftrat.

Fraktionierte Fällung von Protein durch Hitzeschritt: Fällung von Fremdprotein durch 5-10 min Erhitzen des Enzympräparates

in 0,05 M NaPP, pH 7,4, bei 48°C bewirkte keinen Aktivitätsverlust, führte aber auch zu keiner Anreicherung des Enzyms. Nach 15 min Erhitzen bei dieser Temperatur wurden nur 38% der Gesamtaktivität ohne Erhöhung der spezifischen Aktivität wiedergefunden. Wurde das Enzym 15 min lang auf 58°C erhitzt, konnte noch 15% der Gesamtaktivität, wieder ohne Anreicherung des Enzyms, nachgewiesen werden. Oberhalb 58°C wurde das Enzym innerhalb weniger min vollkommen inaktiviert.

Fraktionierte Proteinfällung durch pH-Wert-Erniedrigung: Absenken des pH der Enzymlösung von 7,4 auf 4,5 für 10 min durch Zugabe von 0,2 M Acetatpuffer oder 0,1 N HCl erhöhte die spezifische Aktivität des Enzyms unter 21% Verlust der Gesamtaktivität um das 1,8fache (n=4). Unterhalb pH 3,5 verlor das Enzym innerhalb von 10 min seine gesamte Aktivität.

Fraktionierte Proteinfällung durch Äthanol: Alkohol in 20-50%iger Endkonzentration zerstörte die Aktivität der HMT in 6 Versuchen vollkommen.

3.4.4. Reinigungsverfahren unter Anwendung von Säulenchromatographie

3.4.4.1. Elution mittels eines kontinuierlichen Kochsalzgradienten

Wurde mit dem Ultrazentrifugationsüberstand eine Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose mit einem kontinuierlichen, konvexen Kochsalzgradienten entsprechend den Angaben unter 2.1.2.3. durchgeführt, so enthielten die Fraktionen mit HMT-Aktivität (3. Peak im Elutionsdiagramm (s. Abb. 9a)), $71 \pm 6\%$ der gesamten aufgetragenen Enzymaktivitätsmenge (n=10). Die Anreicherung für die fünf Fraktionen mit der höchsten Enzymaktivität (ca. 40 ml) betrug $8,9 \pm 1,5$ fach.

Wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen wie mit DEAE-Cellulose TEAE-Cellulose als Ionenaustauscher verwendet, so nahm bei gleicher Anreicherung wie nach DEAE-Cellulose die Ausbeute an Gesamtaktivität auf 23% ab.

Hydroxylapatit konnte bei pH 7,4 (entsprechend dem Verfahren mit DEAE-Cellulose) das Enzym nicht binden. Wurde der pH-Wert des 0,01 M NaPP jedoch auf pH 6,5 gesenkt, so wurde eine 5fache Anreicherung des Enzyms erzielt bei einer Ausbeute von 40%.

3.4.4.2. Elution mittels eines diskontinuierlichen (Stufen)-Kochsalzgradienten

Bei Entwicklung von 7 DEAE-Säulen wurde vor Elution des enzymhaltigen Proteins nicht aktives Fremdprotein mittels einer 0,2 M NaCl-Lösung abgelöst, die 0,01 M NaPP, pH 7,4, enthielt. Die Elution des HMT-Aktivität enthaltenden Proteins erfolgte dann mittels 0,5 M NaCl in NaPP, pH 7,4 (entsprechend einer Anzeige von 150 μ S des in der Anlage verwendeten Leitfähigkeitsmeßgerätes mit Durchflußelektrode (s. Abb. 9b)). Zur Prüfung, ob sämtliches aktives Enzymprotein von der Säule eluiert war, wurde darauf mit 1,0 M Salzlösung in NaPP das restliche Protein abgelöst, das aber keine Enzymaktivität mehr enthielt. Mit diesem Verfahren wurden $61 \pm 10\%$ der aufgetragenen Gesamtaktivität wiedergefunden. Die Anreicherung war $11,1 \pm 2,6$ fach (Extremwerte 8,3 und 15,0), was eine Verbesserung gegenüber der Elution mittels eines kontinuierlichen Gradienten um 25% bedeutete.

Wurde TEAE-Cellulose als Ionenaustauscher verwendet, so war die Anreicherung nur 4fach, die Ausbeute an Gesamtaktivität 68%.

Da mit keinem der oben beschriebenen Verfahren bessere Ergebnisse als mit DEAE-Cellulose erreicht werden konnten und das Enzym nach Gelfiltration an Sephadex G 100 sehr instabil war, wurden die für größere Versuchsreihen benötigten Enzymlösungen mittels Ultrazentrifugation und Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose unter Anwendung der diskontinuierlichen Elution hergestellt.

3.5. Eigenschaften der HMT

3.5.1. Physikalisch-chemische Eigenschaften

Über die physikalisch-chemischen Eigenschaften der HMT ist

bis jetzt nur sehr wenig bekannt. Die beschriebenen Versuche beschränkten sich auf die Testung der Stabilität bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit von der Zeit, sowie auf die Untersuchung des Einflusses mehrmaligen Auftauens und Einfrierens auf verschiedene Enzympräparate.

Stabilität der Enzyme bei verschiedenen Lagerungstemperaturen:

Bei Raumtemperatur waren die Verluste an Enzymaktivität für Rohhomogenate und für durch DEAE-Cellulose teilgereinigte Enzymlösungen gleich groß und betrugen bis zu 3 Stunden 0%, bis 24, 48 und 120 Stunden 21, 34 und 100% (n=4). Bei +4°C verloren dagegen dieselben Enzympräparate innerhalb einer Woche keine Aktivität.

Die Stabilität verschiedener Enzympräparationen bei -20°C ist in Tab. 13 aufgeführt. Bei dieser Lagerungstemperatur

Zustand des Enzympräparates	Durchlaufene Anreicherungsschritte	Lagerungszeit (Wochen)	Restaktivität (%)
Lösung in 0,25 M Sucrose	Ultrazentrifugation	1	100
		2	100
		4	100
		8	97
		28	86
Lösung in 0,01 M NaPP, pH 7,4	DEAE-Cellulose Chromatographie	1	100
		2	100
		4	95
		8	88
	DEAE-Cellulose Chromatographie + Sephadex G 100 Gelfiltration	1	64
		2	55
		4	41
		8	0
Lyophilisat	Ammoniumsulfatfällung + Dialyse	1	100
		2	100
		4	100
		8	70

Tab. 13 Stabilität verschiedener AMT-Präparationen nach Lagerung bei -20°C

Mittelwerte aus 2 Versuchen. 100% Enzymaktivität entspricht der Aktivität am Tage der Präparation des Enzyms.

waren die Enzymlösungen nach Ultrazentrifugation, nach Ammoniumsulfatfällung und nach DEAE-Cellulose recht stabil, nicht allerdings die Präparationen nach DEAE-Cellulose plus Sephadex G 100 Gelfiltration. Auch als Lyophilisat war das Enzym nicht beliebig lang lagerbar (Tab. 13).

Einfluß des wiederholten Auftauens und Einfrierens auf die HMT-Aktivität: Rohhomogenat und durch DEAE-Cellulose teilgereinigtes Enzym verhielten sich auch hinsichtlich wiederholten Auftauens und Einfrierens gleich. Nach dem 1. und 2. Auftauen am 1. und 2. Tag nach Einfrieren auf -20°C waren keine Verluste an Enzymaktivität aufgetreten. Beim 3. Auftauen nach 5 Tagen und beim 4. nach 7 Tagen wurden jedoch 5% und 21% Verlust beobachtet ($n=4$).

3.5.2. Enzymatische Eigenschaften

3.5.2.1. Substratspezifität

Donorsubstrat: Als Donorsubstrat für die HMT aus Magenschleimhaut wurde wie bei diesem Enzym aus anderen Organen SAM nachgewiesen (vgl. auch 3.1.1.3.). Die Substratspezifität konnte mit anderen markierten "aktivierten" Methioninen bisher nicht geprüft werden, dafür aber mit 5- $[^{14}\text{C}]$ Methyl-tetrahydrofolat. Da einige Methyltransferasen dieses Donorsubstrat benötigen (72,13, 6, 84) wurde das Gemisch aus nicht-radioaktivem und radioaktivem SAM durch die gleiche Konzentration 5-Methyltetrahydrofolat (spezifische Radioaktivität 61 mCi/mmol) ersetzt. In keinem von 7 Inkubationsansätzen war die Extraktion an radioaktivem Material größer als in den Blanks mit hitzeinaktiviertem Enzym. Unter den gewählten Bedingungen fand also keine Methylgruppenübertragung von 5-Methyltetrahydrofolat auf Histamin statt.

Akzeptorsubstrate: Von einigen Dutzend Imidazolverbindungen und Histaminanalogen wurde bisher nur Histamin selbst als Akzeptorsubstrat der HMT nachgewiesen (25).

Wurden aber die sechs in Abb. 13 genannten Methylhistamine in

dieser Hinsicht geprüft, so konnte nach Zugabe von N'-Methylhistamin eine radioaktive Verbindung in das Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch oder in mit Wasser gesättigtes Butanol extrahiert werden. Unter optimalen Bedingungen für diese Reaktion (2,5 mM Substratkonzentration, pH 8,3, Abb. 10) und etwa gleichen Extraktionsraten für das radioaktive Produkt wie für 1(τ)-Methylhistamin, betrug der Umsatz von N'-Methylhistamin 15% von dem des Histamins. Unter den für Histamin optimalen Inkubationsbedingungen (0,1mM Substratkonzentration, pH 7,4) wurden nur 5-7% der Radioaktivität gefunden, die mit Histamin unter gleichen Bedingungen erhalten wurden. Als mögliches Produkt der Reaktion von N'-Methylhistamin mit HMT und SAM wurde ein in Stellung 1(τ) des Imidazolrings methyliertes N'-Methylhistamin vermutet (1-Methyl-4-(β -methylaminoäthyl)-imidazol; die Synthese dieser Substanz wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben).

Die Auffindung eines zweiten Akzeptorsubstrates der HMT stellt die bisher angenommene absolute Substratspezifität dieses Enzyms in Frage, woraus sich vor allem für die Bestimmung des Histamins mit dem Isotopentest (81, 138) erhebliche Konsequenzen ergeben (s. 4.4.).

3.5.2.2. Michaeliskonstanten

Die Michaeliskonstanten wurden graphisch durch Verwendung von Lineweaver-Burk-Diagrammen (90) ermittelt. Die Ableitung nach Eadie-Hofstee (71) ergab hierzu keine signifikanten Unterschiede.

S-Adenosyl-L-methionin: Unter Anwendung der fluorometrischen Methode und mit einem 6fach angereicherten Enzym (Ultrazentrifugation + Ammoniumsulfatfällung) wurde für SAM ein K_m -Wert von $1,3 \times 10^{-5}M$ gefunden ($n=4$). Die Konzentration von Histamin betrug bei diesem Versuch $1,0 \times 10^{-4}M$. Dieser Wert lag innerhalb der 2 -Streuung für die K_m -Werte, die durch Inkubationen mit der Isotopenmethode unter Verwendung der 30fach und 120fach gereinigten Enzym-Präparationen ermittelt wurden.

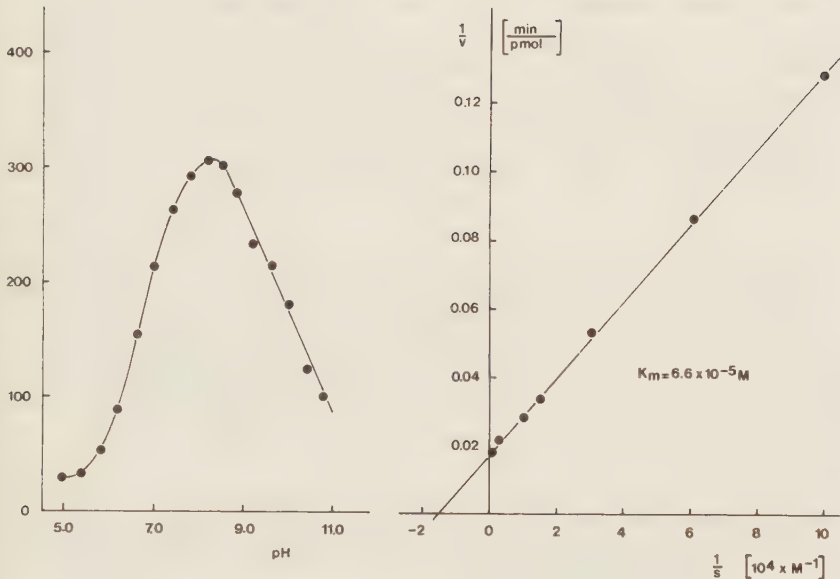


Abb. 10 Abhängigkeit der HMT-Aktivität vom pH-Wert und der Substratkonzentration beim Einsatz von N'-Methylhistamin als Methylakzeptorsubstrat

Bestimmung der Michaeliskonstante durch doppelt reziproke Darstellung nach (90). Mittelwerte aus 2 bzw. 3 Bestimmungen. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1. und Tab. 6.

Acht Versuchsreihen mit je 10 verschiedenen SAM-Konzentrationen ergaben einen K_m -Wert für SAM von $(0,87 \pm 0,24) \times 10^{-5} \text{M}$ (Extremwerte $0,55$ und $1,19 \times 10^{-5} \text{M}$).

Histamin und N'-Methylhistamin: Mit der fluorometrischen Methode und dem durch Ultrazentrifugation + Ammoniumsulfatfällung 6fach angereicherten Enzym wurde für Histamin ein K_m -Wert von $2,3 \times 10^{-5} \text{M}$ ermittelt ($n=4$). Durch Anwendung der

Isotopenmethode waren Inkubationsansätze für das durch Ultrazentrifugation und DEAE-Cellulose sowie das 120fach angereicherte Enzym in größerem Ausmaß durchführbar. So konnte der K_m -Wert von Histamin aus 22 Lineweaver-Burk-Diagrammen, die durch Inkubationen bei mindestens 8 verschiedenen Histaminkonzentrationen erhalten worden waren, genauer bestimmt werden. Er betrug $(1,71 \pm 0,27) \times 10^{-5} M$ (Extremwerte 1,25 und $2,78 \times 10^{-5} M$).

Wurde N'-Methylhistamin als Substrat eingesetzt, so betrug der K_m -Wert für diesen Methylgruppenakzeptor $6,6 \times 10^{-5} M$ (Abb.10).

Da die K_m -Werte für SAM und Histamin auf verschiedenen Stufen der Anreicherung sich nicht signifikant veränderten, war anzunehmen, daß die Werte zuverlässig waren und in allen Präparationen das gleiche Enzym vorgelegen hatte.

3.5.3. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der HMT

3.5.3.1. Festlegung des Grundtyps des Reaktionsmechanismus durch vier Kriterien

Bei der durch HMT katalysierten Transmethylierung werden zwei Substrate, SAM und Histamin, zu zwei Produkten, SAH und 1(τ)-Methylhistamin, umgesetzt (s. Abb. 1).

Der Mechanismus enzymkatalysierter Reaktionen, an denen zwei oder mehr Substrate beteiligt sind, verläuft nach zwei generell verschiedenen Typen: 1. Nach dem Sequentialmechanismus, bei dem zuerst alle Substrate mit dem Enzym einen Komplex bilden müssen, bevor eines der Produkte freigesetzt wird. 2. Nach dem "Ping-Pong"- oder Enzymsubstitutionsmechanismus, bei dem schon eines oder mehrere Produkte aus dem Enzym-Substrat-Komplex freigesetzt werden, bevor sich alle Substrate an das Enzym angelagert haben.

Die "Steady-State"-Kinetik dieser beiden Reaktionstypen wurde von Alberty (2), Dalziel (44, 45) und Cleland (27, 28, 29, 31) entwickelt. Wie bei der Michaelis-Menten-Kinetik lassen sich dabei die relativ komplizierten Zusammenhänge mit Diagrammen

darstellen, mit deren Hilfe der Reaktionsmechanismus eines Enzyms dem einen oder dem anderen Typ zugeordnet werden kann.

Vier Kriterien wurden im folgenden angewendet, um herauszufinden, ob Histamin und SAM mit der HMT aus Schweineantrum nach einem "willkürlichen" bzw. "geordneten" Sequentialmechanismus (s. 3.5.3.2.) oder nach einem Enzymsubstitutionsmechanismus reagieren. Voraussetzung hierfür war die Durchführung der Experimente im Bereich der Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion.

1. Kriterium: K_m -Werte des 1. Substrates in Abhängigkeit von der Konzentration des 2. Substrates.

Nach Henson und Cleland (66) wird die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Konzentration des einen Substrates bestimmt, wobei die Konzentration des zweiten Substrates auf mehreren Niveaus konstant gehalten wird. Werden die Ergebnisse dieses Versuchs im Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt, so erhält man ein Bündel von Geraden, die sich beim Sequentialmechanismus links von der y-Achse schneiden, (K_m für jedes Substrat also unabhängig von der Konzentration des anderen Substrates), während sie beim "Ping-Pong"-Mechanismus parallel zueinander verlaufen, was eine Abhängigkeit der K_m des einen Substrates von der Konzentration des zweiten Substrates bedeutet.

Trägt man die y-Achs-Abschnitte dieses erwähnten Lineweaver-Burk-Diagramms gegen die jeweilige konstant gehaltene Konzentration des zweiten Substrates in einem zweiten Diagramm auf, so erhält man ein Sekundärdiagramm nach Cleland (27, 28, 29). Ergibt diese Darstellung eine Gerade, so liegt ein "Ping-Pong"-Mechanismus vor, ist dies nicht der Fall, dann muß ein Sequentialmechanismus angenommen werden.

Mit 30fach angereicherter HMT wurde die Bildungsgeschwindigkeit von 1(τ)-Methylhistamin in Abhängigkeit von der Histaminkonzentration bei vier verschiedenen, für jede Serie von Histaminkonzentrationen aber konstant gehaltenen SAM-Konzentrationen

onen bestimmt. Das aus diesen Ergebnissen ermittelte Lineweaver-Burk- und Sekundärdiagramm nach Cleland sprechen für einen Sequentialmechanismus der Transmethylierungsreaktion (Abb. 11).

2. Kriterium: Sekundärdiagramm nach Dervartanian et al. (47).

Wie nach Henson und Cleland (66) wird die Reaktionsgeschwindigkeit der 1(τ)-Methylhistaminbildung in Abhängigkeit von der Konzentration des einen Substrates bestimmt, wobei die Konzentration des zweiten Substrates auf mehreren Niveaus konstant gehalten wird. Aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm, das mittels der Ergebnisse dieses Versuches gezeichnet wird, werden die verschiedenen K_m -Werte bei verschiedenen Konzentrationsniveaus des konstant gehaltenen zweiten Substrates ermittelt und gegen die entsprechenden, ebenfalls ermittelten v_{max} -Werte in einem Sekundärdiagramm aufgetragen. Da beim Vorliegen eines "Ping-Pong"-Typs im Lineweaver-Burk-Diagramm parallele Regressionsgeraden erhalten werden, muß im Sekundärdiagramm die resultierende Gerade durch den Ursprung verlaufen.

Für die Darstellung des Sekundärdiagramms nach Dervartanian et al. (47) wurden dieselben experimentellen Ergebnisse wie beim 1. Kriterium verwendet. Da mit verschiedenen Konzentrationsniveaus des zweiten Substrates (SAM) einerseits verschiedene v_{max} -Werte, andererseits aber immer dieselben K_m -Werte für das erste Substrat (Histamin) gefunden wurden (vgl. Abb. 11), verläuft die Kurve des Sekundärdiagramms nicht als Gerade durch den Ursprung. Damit ist ein Reaktionsmechanismus vom Enzymsubstitutionstyp auszuschließen.

3. Kriterium: Lineweaver-Burk-Diagramm bei konstantem Verhältnis beider Substrate.

Schließlich kann man den Typ des Reaktionsmechanismus noch durch Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion als einer Funktion der Konzentration des einen Substrates herausfinden, wobei das molare Verhältnis beider Substrate konstant gehalten wird (66, 149). Im Falle eines "Ping-Pong"-Mechanismus müßte diese Funktion eine Gerade ergeben.

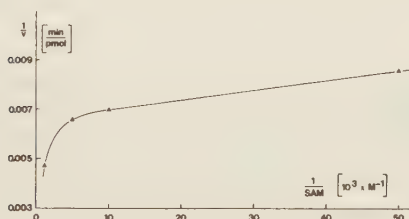
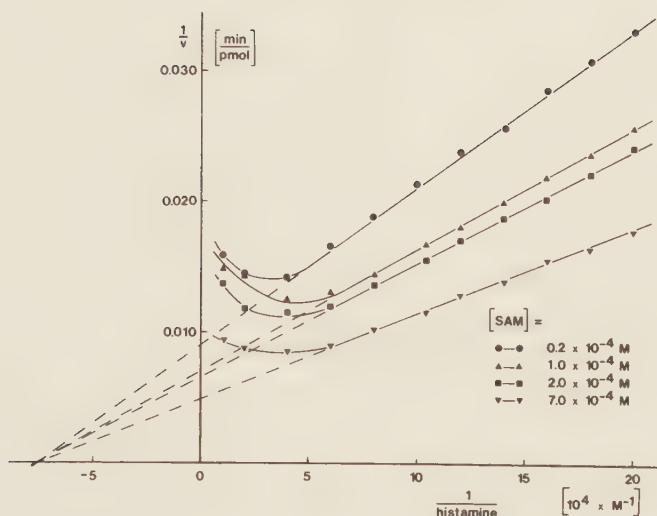


Abb. 11 Lineweaver-Burk-Diagramm und Sekundärdiagramm nach Cleland für die Beziehung zwischen der Bildungsgeschwindigkeit von 1(7)-Methylhistamin und der Histaminkonzentration bei vier verschiedenen SAM-Konzentrationen

Zur Konstruktion der Diagramme s. Text unter 3.5.3.1. Mittelwerte aus 2 Versuchen. Es wurde ein Enzympräparat nach DEAE-Cellulose verwendet. Spez. Akt. 2,51 nmol/(min x mg Protein). 50 µg Protein/Ansatz. Zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1. Der Korrelationskoeffizient war für alle Regressionsgeraden im linearen Bereich $< 0,98$. Alle Regressionsgeraden in diesem und allen folgenden Lineweaver-Burk-Diagrammen wurden mit Hilfe eines Tischcomputers berechnet.

In Abb. 12 ist ein solches Experiment dargestellt, bei dem das Verhältnis SAM zu Histamin über alle Konzentrationsänderungen von SAM bei 3,45 belassen wurde. In einem Konzentrationsbereich des SAM von $0,2-1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ scheint sich eine Gerade zu ergeben, doch verläuft die Kurve unterhalb $0,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ nicht mehr als Gerade. Das Umbiegen bei höheren SAM-Konzentrationen ist auf die überoptimale Histaminkonzentration zurückzuführen (vgl. 3.1.1.3.). Die fehlende Linearität der Regressionsgeraden im Lineweaver-Burk-Diagramm spricht wiederum gegen das Vorliegen eines "Ping-Pong"-Mechanismus.

4. Kriterium: Produktinhibierung.

Ein "Ping-Pong"-Mechanismus kann nach Cleland (31) auch auf Grund von Versuchen zur Produktinhibierung bestätigt oder ausgeschlossen werden. In der Vorstellung, daß beim "Ping-Pong"-Mechanismus jeweils eines der beiden Substrate das andere im aktiven Zentrum des Enzyms ablöst und ein ähnliches Verhalten auch bei der Rückreaktion für die beiden Produkte der Hinreaktion gilt, müßte SAH ein kompetitiver Hemmstoff zu Histamin und 1(τ)-Methylhistamin ein kompetitiver Hemmstoff zu SAM sein.

Die experimentelle Prüfung dieses Kriteriums mit der HMT aus Magenschleimhaut des Schweineantrums ergab, daß SAH ein nicht-kompetitiver Hemmstoff zu Histamin (3.5.4.2.3) und 1(τ)-Methylhistamin ein nicht-kompetitiver Hemmstoff zu SAM ist (3.5.4.2.1.). Damit weist auch dieses 4. Kriterium den Reaktionsmechanismus der durch HMT katalysierten Transmethylierung als einen Sequenztyp aus.

Die genannten vier Kriterien sprechen dafür, daß der Reaktionsmechanismus der Methylierung des Histamins unter Katalyse von HMT aus Schweineantrummmucosa nach dem "intersecting"- oder Sequentialmechanismus abläuft (31).

3.5.3.2. Argumente für einen geordneten Sequentialtyp der Reaktion und Formulierung des Reaktionsmechanismus

Die Bildung eines ternären SAM-Histamin-Enzymkomplexes kann auf verschiedene Arten erfolgen (31): 1. Nach dem "random"-

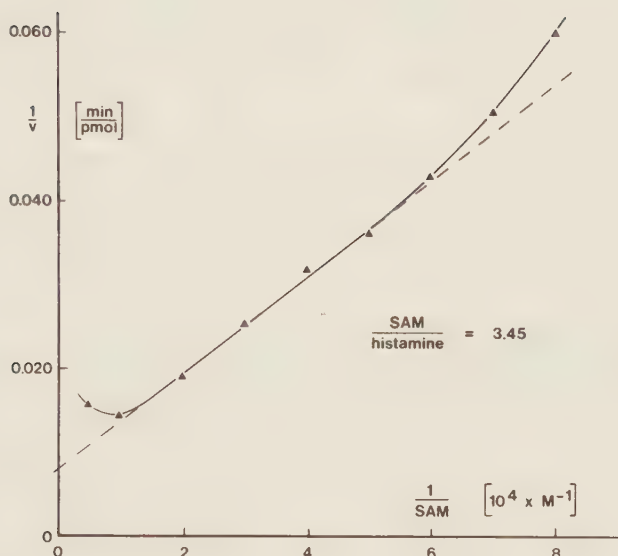


Abb. 12 Doppelt reziproke Darstellung der Anfangsgeschwindigkeit der durch HMT katalysierten Methylierung gegen die SAM-Konzentration unter Konstanthalten des Konzentrationsverhältnisses SAM / Histamin

Mittelwerte aus 2 Bestimmungen. Es wurde ein Enzympräparat nach DEAE-Cellulose verwendet (spez. Aktivität 2,51 nmol/(min x mg Protein). Zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1. Insgesamt wurden pro Ansatz 50 µg Protein eingesetzt.

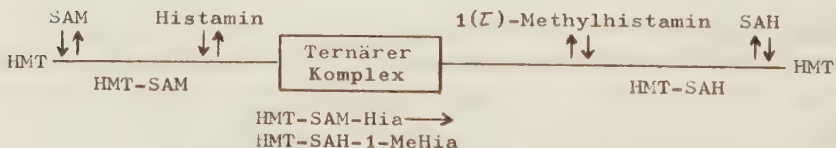
Mechanismus, bei dem die Anlagerung der beiden Reaktionspartner an das Enzym in beliebiger Reihenfolge erfolgen kann.

2. Nach dem "ordered"- oder "rapid equilibrium ordered"-Mechanismus, bei dem die Anlagerung des SAM und des Histamins an das Enzym in definierter Reihenfolge erfolgen muß.

Welcher dieser beiden Mechanismen für die HMT aus Schweinemagen zutrifft, kann anhand der Produktinhibierung abgeschätzt werden (31). Beim "random"-Typ muß ein Produkt als kompetitiver Hemmstoff des einen Substrates auch das andere Substrat kompetitiv hemmen, beim "ordered"-Typ ist dies nicht der Fall (111, 31).

Wie Abb. 18 zeigt, hemmt SAH die HMT aus Schweinemagen kompetitiv gegenüber SAM, aber nicht kompetitiv gegenüber Histamin. Offensichtlich konkurriert SAH nur mit SAM um die gleiche Form des Enzyms, d.h. um das freie Enzym oder um den mit dem Cosubstrat gesättigten Enzymkomplex. Dieses Muster der Produktinhibierung kommt bei dem gewöhnlich als einem "ordered-sequential"-Mechanismus interpretierten Typ vor (31), wobei alle Reaktionsschritte außer der Umwandlung innerhalb des ternären Komplexes (Histamin-Enzym-SAM $\longrightarrow$ 1(Σ)-Methylhistamin-Enzym-SAH) als reversibel angesehen werden. Ionenaustauschversuche (120) zur Klärung der Frage, ob Substrate und Produkte nach einem "ordered"- oder "random-sequential"-Mechanismus an das Enzym angelagert und von diesem wieder freigesetzt werden, können bei einem Enzym wie der HMT, die eine irreversible Reaktion katalysiert, nicht durchgeführt werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse und dem Befund, daß der K_m -Wert für SAM ($0,87 \times 10^{-5}M$) kleiner ist als der für Histamin ($1,71 \times 10^{-5}M$) und damit das SAM eine größere Affinität zum Enzym zeigt als Histamin, kann man den Reaktionsmechanismus der Histaminmethylierung nach der Cleland'schen Kurzschreibweise (31) wie folgt skizzieren:



3.5.4. Hemmstoffe der HMT aus Schweineantrumucosa

Da durch Hemmstoffversuche sowohl ein Beitrag zur Aufklärung der enzymatischen Eigenschaften der HMT und der von ihr katalysierten Reaktion geleistet als auch die mögliche physiologische Bedeutung der HMT bei der Magensaftsekretion untersucht werden sollte, waren die angewandten Inhibitoren chemisch sehr verschieden. Die Gründe für die Auswahl der entsprechenden Stoffe wurden deshalb zur leichteren Orientierung in Tab. 14 zusammenfassend angegeben. Der Einfluß einiger

Substanzgruppen	Charakterisierung des Enzyms	Aussage über Reaktionsmechanismus	Vorkommen in der Magenschleimhaut	Beeinflussung der Magensaftsekretion	Wirkung an Histaminrezeptoren
SH-Reagenzien	+				
Thiole	+				
Metallionen	+				
Histamin		+	+ (104)	+ (121)	+ (121)
SAH		+	+		
SAH-Analoga	+	+			
1(L)-Methylhistamin		+	+		
andere methylierte Histamine		+	+ (116)	+ (34)	+ (18)
H ₁ -Rezeptorantagonisten		+		+ (75)	+ (75)
H ₂ -Rezeptorantagonisten		+			+ (18) (19)
Antimalariamittel				+ (148) (14)	

Tab. 14 Kriterien für die Auswahl von Substanzen als mögliche Hemmstoffe der HMT

Die Ziffern in Klammern entsprechen den Literaturzitationen.

dieser untersuchten Stoffe auf die Enzymaktivität war auch deshalb von Interesse, da sie bereits als in vitro- oder in vivo-Hemmstoffe der HMT aus anderen Organen bekannt waren (s. 1.3.).

3.5.4.1. Histamin und Histaminanaloge

Wie aus Abb. 6 zu ersehen ist, wurde die HMT durch sog. "überoptimale" Histaminkonzentrationen gehemmt. Tab. 15 zeigt einige mit Histamin verwandte Verbindungen, von denen nur 3-(β -Aminoäthyl)-pyrazol (Betazol^(R)) und 4-Aminomethyl-imidazol eine relativ geringe Hemmwirkung in höheren Konzentrationen zeigten. Kleinere Veränderungen im Stickstoffheterozyklus und eine Verkürzung der Aminoäthylseitenkette des Histamins führten also zu Verbindungen, die noch Zugang zum reaktiven Zentrum des Enzyms hatten. Weitergehende Veränderungen bei histaminähnlichen Verbindungen ergaben inhibitorisch unwirksame Substanzen.

Histaminanaloge	% Enzymaktivität bei einer molaren Konzentration des Substratanalogen von				
	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}
4-Aminomethyl-imidazol	58	76	80	87	97
3-(β -Aminoäthyl)-pyrazol	58	66	85	89	-
4-Imidazolyl-glycin	100	100	100	100	100
N-Acetyl-4-Imidazolyl-glycin	95	100	100	100	100
4-Imidazolyl-brenztraubensäure	100	100	100	100	-
4-Imidazolyl-essigsäure	84	87	90	93	-
1-Methyl-4-Imidazolyl-essigsäure	90	94	100	100	-

Tab. 15 Hemmung der HMT-Aktivität durch Histaminanaloge

Inkubationsansätze ohne Histaminanaloge enthielten 100% Enzymaktivität. Mittelwerte aus 4 Bestimmungen. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1. Spez.Akt. 2,86 nmol/(min x mg Protein); 50 μ g Protein/Ansatz.

3.5.4.2. Produkte und Produktanaloge

3.5.4.2.1. Hemmung der HMT durch 1(π)-Methylhistamin und andere methylierte Histamine

In Inkubationsansätzen mit Rohenzym und teilgereinigten Enzympräparaten war 1(π)-Methylhistamin ein relativ starker Inhibitor der HMT aus Schweineantrum- (Abb. 13) und Menschencorpus-schleimhaut (50% Inhibierung bei 0,1 bzw. 0,8 mM Konzentration).

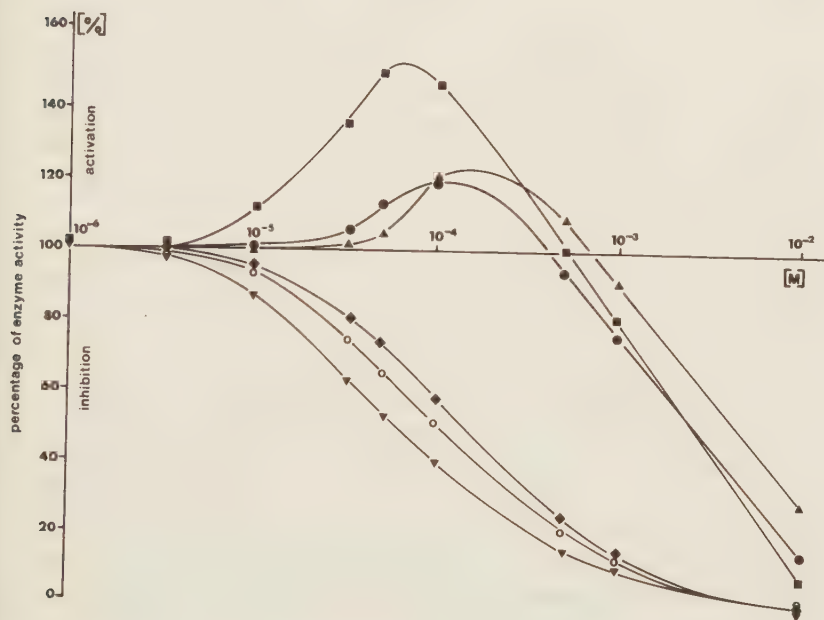


Abb. 13 Hemmung und Aktivierung von teilgereinigter HMT aus Schweineantrummucosa durch methylierte Histamine

O—O 1(π)-Methylhistamin (MH); ∇ — ∇ 2-MH; $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$ 3(π)-MH;
 $\bullet$ — $\bullet$ 5-MH; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ N'-MH; $\blacksquare$ — $\blacksquare$ N,N'-Dimethylhistamin.
 Die Enzymaktivität von Kontrollansätzen ohne eines der methylierten Histamine ist gleich 100%. Jeder Punkt ist das Mittel aus 4-6 Bestimmungen. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1. Spez.Akt. 4,04 nmol/(min x mg Protein); 49 μ g Protein/Ansatz.

2-Methyl- und 3(π)-Methylhistamin hatten ein ähnliches Hemmvermögen wie das 1(ζ)-Methylhistamin (Abb. 13), wogegen 5-Methylhistamin, N'-Methylhistamin und N',N'-Dimethylhistamin nur relativ schwache Inhibitoren mit einem ID₅₀-Wert von 3 mM waren. Dagegen konnten diese drei Substanzen die Aktivität der HMT steigern, N',N'-Dimethylhistamin in 50 μ M Konzentration z.B. um 50% (s. 3.5.4.2.2.).

Auch der Hemmtyp war unterschiedlich für diese beiden Gruppen von methylierten Histaminen. 1(ζ)-Methylhistamin zeigte ebenso wie die anderen methylierten Histamine, die das Enzym nur hemmten, eine Mischung aus nicht- und unkompetitiver Hemmung im Lineweaver-Burk-Diagramm gegenüber Histamin als Substrat (Abb. 14), während die aktivierenden Methylhistamine in niedrigerer Konzentration das Enzym gegenüber Histamin kompetitiv hemmten.

Der Hemmtyp gegenüber SAM wurde nur für das Methylierungsprodukt 1(ζ)-Methylhistamin untersucht und erwies sich als nicht-kompetitiv gegenüber dem Donorsubstrat (Abb. 15).

3.5.4.2.2. Aktivierung der HMT durch methylierte Histamine sowie verschiedene andere Substanzen

Die Aktivierung der HMT aus Schweineantrum wurde nicht nur bei der genannten Gruppe von methylierten Histaminen, sondern auch bei SAH-Analogen (s. 3.5.4.2.3.), bei SH-Gruppen Protektoren (s. 3.5.4.4.) und bei H₁- und H₂-Rezeptorantagonisten und verschiedenen Phenothiazinen (s. 3.5.4.7.) beobachtet. Der Mechanismus dieser Aktivierung wurde im Falle des N',N'-Dimethylhistamins genauer untersucht.

Nicht nur methylierte Histamine, sondern auch Histamin selbst war in Konzentrationen über 0,10-0,15 mM (s. Abb. 6, 16, 17), die immer noch unter Substratsättigung liegen, ein Hemmstoff der HMT. Deshalb bestand die Frage, ob die methylierten Histamine das Enzym tatsächlich durch Erhöhung von $v_{\max}$ oder durch Verminderung der Teilinhibierung des Enzyms durch hohe, sog. "optimale" Histaminkonzentrationen aktivierten.

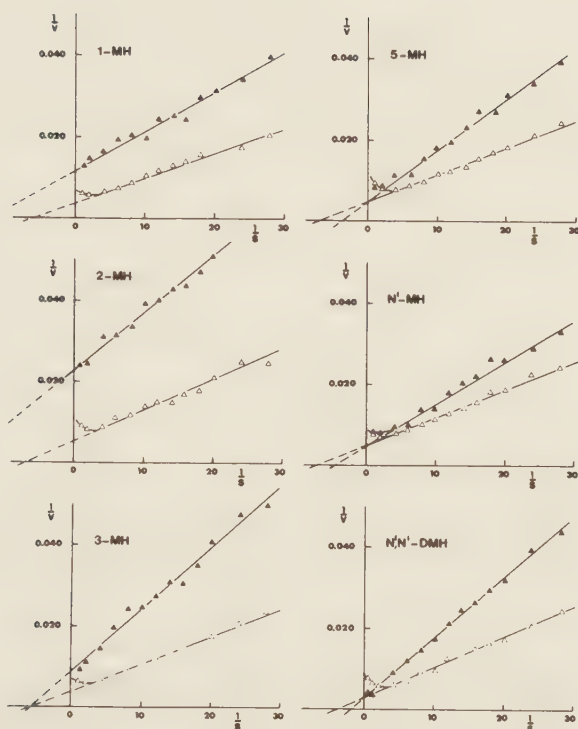


Abb. 14 Lineweaver-Burk-Diagramme von HMT-Aktivität bei verschiedenen Histaminkonzentrationen mit (▲—▲) und ohne (△—△) die Zugabe verschiedener methylierter Histamine

v [pmol/min]; s [10^{-4} M]. Mittelwerte aus 2 Bestimmungen. Die InhibitorKonzentration für 1(τ)-Methylhistamin (1-MH), 2-MH, 3(π)-MH, 5-MH und N'-MH war $1,0 \times 10^{-4}$ M, für N',N'-Dimethylhistamin $2,0 \times 10^{-4}$ M. Der Korrelationskoeffizient war für alle Regressionsgeraden $< 0,98$. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1. Spez. Akt. $4,04$ nmol/(min $\times$ mg Protein); 38-58 μ g Protein/Ansatz.

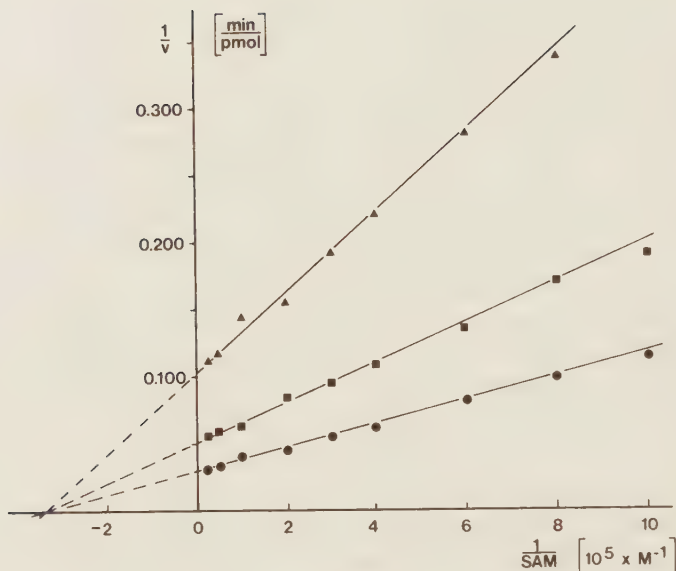


Abb. 15 Lineweaver-Burk-Diagramm von HMT-Aktivität bei verschiedenen SAM-Konzentrationen mit und ohne Zugabe von 1(τ)-Methylhistamin

●—● Inkubationen ohne 1(τ)-Methylhistamin (1-MH);
 ■—■ Zugabe von $1,0 \times 10^{-4} M$ 1-MH; ▲—▲ Zugabe von $2,0 \times 10^{-4} M$ 1-MH. Mittelwerte aus 2 Bestimmungen. Der Korrelationskoeffizient war für alle Regressionsgeraden $< 0,98$. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1. Spez. Aktivität $1,45 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg Protein})$; $28 \mu\text{g Protein/Ansatz}$.

Die Inhibierung der HMT durch hohe Histaminkonzentrationen und die Aktivierung durch N,N' -Dimethylhistamin waren unabhängig von der Konzentration des SAM ($10\text{--}350 \text{ nmol}/0,5 \text{ ml}$ Inkubationsansatz). Dies zeigte, daß keine gegenseitige Beeinflussung von Histamin oder N,N' -Dimethylhistamin und dem Methylendonor bestand, und daß Histamin und N,N' -Dimethylhistamin direkt auf das Enzym wirkten.

Der Einfluß von $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ N',N'-Dimethylhistamin auf die Bildung von 1(7)-Methylhistamin in Abhängigkeit von der Histaminkonzentration ist in Abb. 16 dargestellt. Die doppelt reziproke Darstellung (Abb. 17) zeigt, daß sich die beiden Regressionsgeraden der Inkubationen mit und ohne N',N'-Dimethylhistamin ($2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$) auf der Ordinate schneiden. Damit war

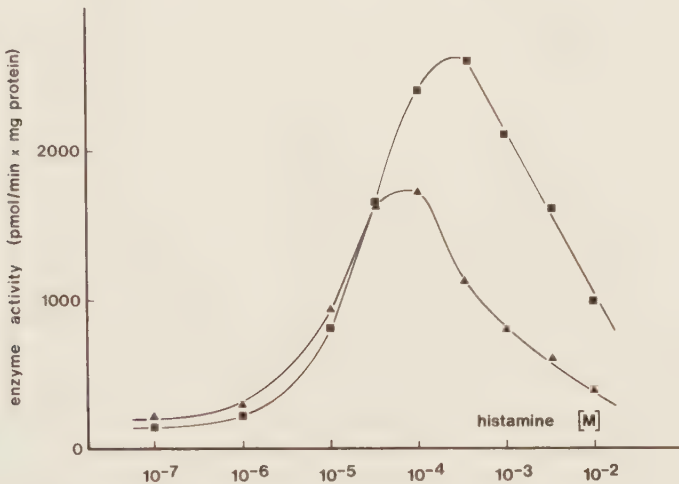


Abb. 16 Hemmung der teilweise gereinigten HMT aus Schweine-
magen durch "überoptimale" Histaminkonzentrationen
und die Beeinflussung dieser Hemmung durch N',N'-Di-
methylhistamin

Inkubationen ohne (▲—▲) und mit (■—■) Zugabe von N',N'-Dimethylhistamin ($1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$). Mittelwerte aus 4 Versuchen. Zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1. $49 \mu\text{g}$ Protein/Ansatz.

v_{max} in beiden Fällen gleich groß. Eine wahre Aktivierung des Enzyms durch N',N'-Dimethylhistamin fand also nicht statt. Es wurde lediglich die optimale Reaktionsgeschwindigkeit, die mit Histamin allein erreicht wurde, um 35-40% vergrößert.

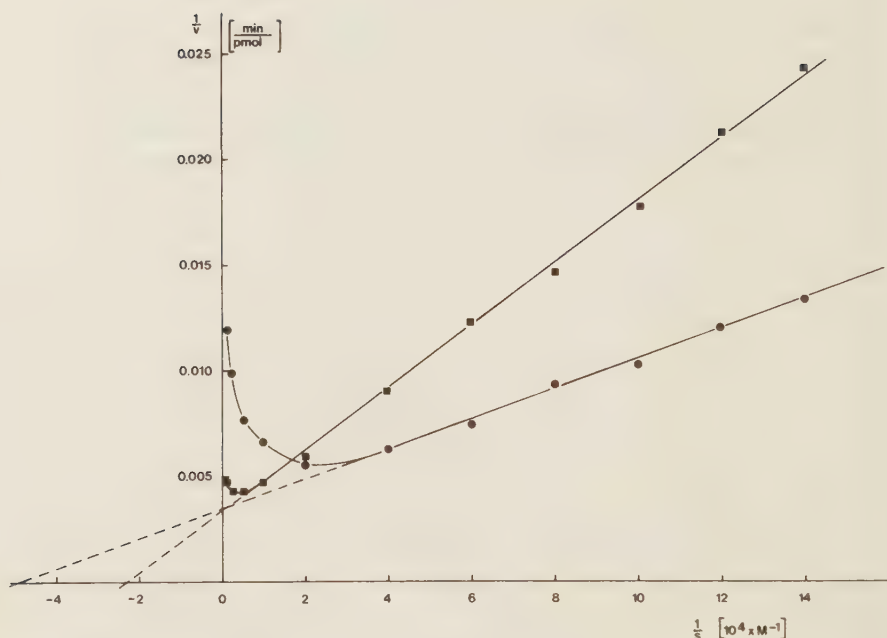


Abb. 17 Lineweaver-Burk-Darstellung der HMT-Aktivität bei verschiedenen Histaminkonzentrationen mit (■ — ■) und ohne (● — ●) Zugabe von N',N' -Dimethylhistamin

Konzentration an N',N' -Dimethylhistamin $2,0 \times 10^{-4} M$. Mittelwerte aus 2 Bestimmungen. Die linearen Anteile der Regressionsgerade wurden nach der Gleichung $y = ax + b$ berechnet. Der Korrelationskoeffizient war für beide Wertegruppen $r = 0,99$. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1. Spez. Akt. $4,04 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg Protein})$; $41 \mu\text{g Prot.}/\text{Ansatz}$.

Die für die Transmethylierung optimale Histaminkonzentration wurde dabei von $0,2 \text{ mM}$ auf $0,4 \text{ mM}$ erhöht. So "aktivierte" N',N' -Dimethylhistamin die HMT sehr wahrscheinlich nur durch Verminderung der durch hohe Konzentrationen seines natürlichen Substrates Histamin bewirkten Substrathemmung.

Eine weitere Möglichkeit, die "Aktivierung" der HMT durch verschiedene Verbindungen zu erklären, besteht in der Bildung von markierten, in das Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch extrahierten Substanzen im Inkubationsansatz. HMT selbst oder andere, bei der Teilreinigung noch nicht abgetrennte Methyltransferasen könnten hierfür verantwortlich sein.

So sind auf Grund einer Methylierung von N'-Methylhistamin (s. 3.5.2.1.) durch HMT ungefähr 50% der "Aktivierung" des Enzyms durch diese Substanz auf eine Extraktion des Methylierungsproduktes von N'-Methylhistamin zurückzuführen.

Deshalb untersuchten wir auch, ob die anderen obengenannten Hemmstoffe und "Aktivatoren" der HMT aus Schweineantrum zur Bildung markierter, in das Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch extrahierbarer Substanzen führte, wenn sie unter Standardbedingungen (s.2.2.1.1. und Tab. 6) mit dem Enzym inkubiert wurden. Geprüft wurden außer den methylierten Histaminen (s. 3.5.2.1.) sämtliche in den Abb. 23, 24, 25, 28 genannten H_1 - und H_2 -Rezeptorantagonisten, die in Tab.20 aufgeführten Phenothiazine und S-[N⁶-Dimethyl-3-deazaadenosyl]-L-homocystein. Mit keiner dieser Verbindungen als Substrat wurde nach der Inkubation eine über den Blankwert hinausgehende Radioaktivität im Toluol/Isoamylalkohol-Gemisch erhalten.

3.5.4.2.3. Hemmung und Aktivierung der HMT durch SAH und SAH-Analoge

S-Adenosyl-L-homocystein, eines der Produkte der Methylierung, ist ein guter Inhibitor der HMT mit einem ID_{50} -Wert von $2,0 \times 10^{-4}M$ (Tab. 16). Der Hemmtyp ist kompetitiv gegen SAH und nicht-kompetitiv gegen Histamin als Substrat (Abb. 18).

Die Hemmung der HMT durch SAH-Analoge, die in der Purinbase verändert waren, war stärker als bei den Substanzen, die eine Pyrimidinbase oder eine veränderte Aminosäureseiten-

Substanz	ID ₅₀	Hemmtyp bei variablen Konzentrationen von	
		Histamin	SAH
S-Adenosyl-L-homocystein	2×10^{-4}	nicht-kompetitiv	kompetitiv
S-Adenosyl-D-homocystein	5×10^{-4}	nicht-kompetitiv	kompetitiv
S-Adenosyl-L-cystein	$\sim 1 \times 10^{-2}$	?	kompetitiv
S-Guanosyl-D,L-homocystein	5×10^{-4}	nicht-kompetitiv	kompetitiv
S-Cytidyl-L-homocystein	-	-	-
S-3-Deazaadenosyl-L-homocystein	$\sim 2 \times 10^{-3}$	nicht-kompetitiv	?
S-[N ⁶ -Methyl-adenosyl]-D,L-homocystein	$\sim 5 \times 10^{-3}$	nicht-kompetitiv	kompetitiv
S-[N ⁶ -Dimethyl-3-deazaadenosyl]-L-homocystein	-	-	-

Tab. 16 Hemmung der HMT durch SAH und einige seiner Analogen

Die ID₅₀-Werte sind Mittelwerte aus 4-6 Bestimmungen. Der Hemmtyp wurde aus Lineweaver-Burk-Diagrammen in 2 x 2 Serien von Experimenten ermittelt. Die spezifische Enzymaktivität war 2,0 nmol/min. "?" bedeutet "nicht ermittelt", da zu geringe Mengen des entsprechenden Inhibitors vorhanden waren. "-" bedeutet "keine Hemmung". Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

kette enthielten (Tab. 16). So bewirkten nur S-Adenosyl-D-homocystein und S-Guanosyl-D,L-homocystein eine Hemmung, die in derselben Größenordnung wie die durch S-Adenosyl-L-homocystein lagen. Während S-3-Deazaadenosyl-L-homocystein und S-[N⁶-Methyl-adenosyl]-D,L-homocystein noch schwache Inhibitoren waren, war S-Cytidyl-L-homocystein ohne Einfluß auf die HMT-Aktivität.

Alle untersuchten SAH-Analogen zeigten in Lineweaver-Burk-Diagrammen eine kompetitive Hemmung gegen SAH und eine nicht-kompetitive gegen Histamin (Tab. 16).

S-[N⁶-Dimethyl-3-deazaadenosyl]-L-homocystein zeigte bei optimaler Histamin- und SAH-Konzentration im gesamten unter-

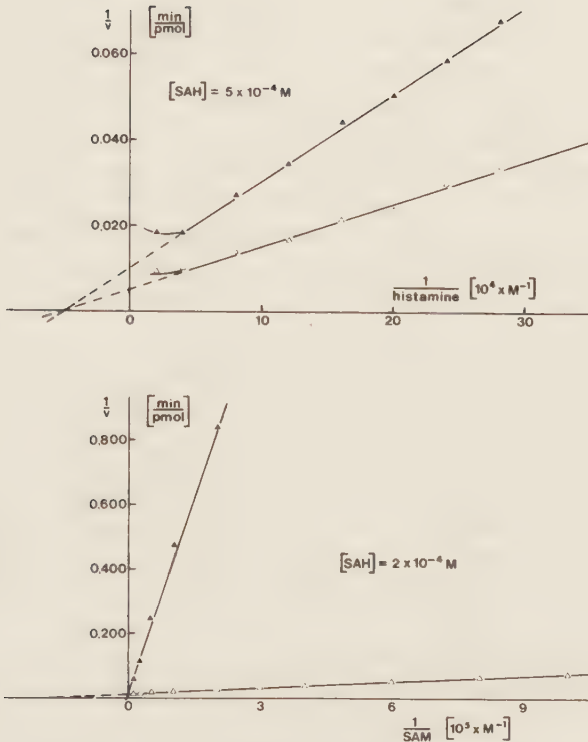


Abb. 18 Lineweaver-Burk-Diagramme der HMT-Aktivität bei verschiedenen Histamin- bzw. SAM-Konzentrationen mit (▲—▲) und ohne (Δ—Δ) Zugabe von SAH

Mittelwerte aus 2-3 Bestimmungen. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1. Spez. Akt. 3,33 nmol/(min x mg Protein); 38 μg Protein/Ansatz.

suchten Konzentrationsbereich von 10^{-6} bis 10^{-3} M keine Hemmung, sondern nur eine Steigerung der Enzymaktivität, die bei 10^{-3} M Konzentration 40% betrug. Diese Zunahme der Enzymaktivität bei hohen Histamin-Konzentrationen, eine nicht-kompetitive

Hemmung des Enzyms bei niedrigen SAM-Konzentrationen und eine kompetitive Hemmung bei niedriger Histamin-Konzentration (Abb. 19) sprachen dafür, daß diese Substanz mehr als ein Analoges des N',N'-Dimethylhistamins (s. 3.5.4.2.2.) als ein Analoges des SAH angesehen werden mußte. Die Erklärung für diesen Befund könnte die formale Anwesenheit von N',N'-Dimethylhistamin im N⁶-Dimethyl-3-deazaadenosinrest sein (vgl. Abb. 2). HMT aus Meerschweinchenhirn wurde durch $0,2 \times 10^{-3} \text{M}$ und $2,0 \times 10^{-3} \text{M}$ Konzentration dieser Substanz nicht aktiviert (24), was auf die geringe Histaminkonzentration in den Ansätzen dieser Autoren zurückzuführen sein dürfte.

Die einzige dem SAH analoge Verbindung, die in der Aminosäureseitenkette verändert war und noch eine geringe Hemmung des Enzyms zeigte, war S-Adenosyl-L-Cystein. Andere zu SAH analoge Substanzen, bei denen die Homocysteinkette durch Cysteamin, Thiopropionsäure, Thiopropan-1,2-diol, Thioäthanol, Äthan-1,2-diol, Isobutanthiol oder 1-Butanthiol ersetzt waren, zeigten in 4 Versuchsserien und einem untersuchten Konzentrationsbereich von 10^{-6} bis 10^{-3}M keinen Einfluß auf das Enzym.

3.5.4.3. Sulfhydryl-Reagenzien

p-Hydroxymercuribenzoat war der stärkste Hemmstoff aus der Gruppe der Sulfhydryl-Reagenzien mit einem ID₅₀-Wert von $6,0 \times 10^{-6} \text{M}$ (Abb. 20). Die Konzentrations-Hemmkurve ist sigmoid und verläuft sehr steil, was man von einem Inhibitor erwartet, der sich mit hoher Affinität an reaktive Gruppen im Enzym bindet (154).

N-Äthylmaleimid, an dessen Doppelbindung sich SH-Gruppen additiv anlagern können, und das eine hohe Selektivität für SH-Gruppen zeigt (155), hemmte das Enzym ebenfalls stark (Abb. 20).

Jodacetamid, eine SH-Gruppen alkylierende Substanz, zeigte dagegen nur eine schwache Hemmung des Enzyms (Abb. 20).

Die durch p-Hydroxymercuribenzoat erzeugte Hemmung der HMT war mit Glutathion in 10^{-3} und 10^{-4}M Konzentration voll re-

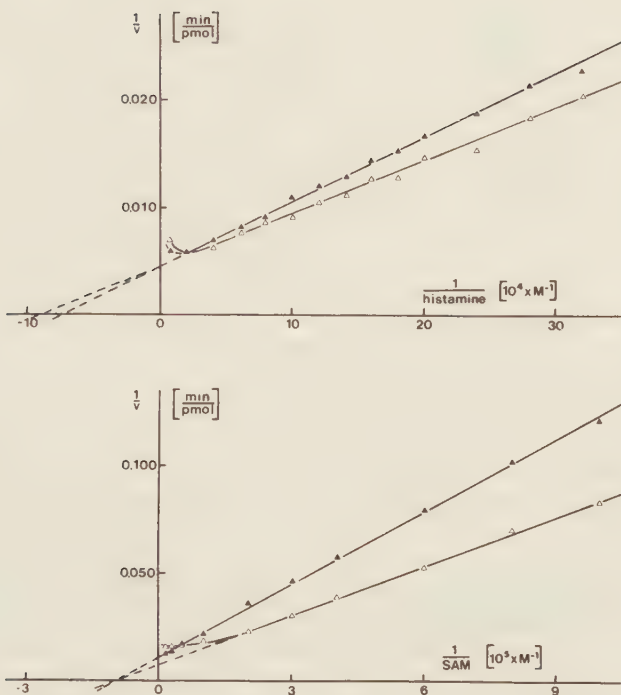


Abb. 19 Lineweaver-Burk-Diagramme der HMT-Aktivität bei verschiedenen Histamin- bzw. SAM-Konzentrationen mit (▲—▲) und ohne (△—△) Zugabe von S-[N⁶-Dimethyl-3-deaza-adenosyl]-L-homocystein
Inhibitorkonzentration $5,0 \times 10^{-4}$ M. Mittelwerte aus 2 Bestimmungen. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1. Spez. Akt. 3,33 nmol/(min x mg Protein); 60 µg Protein/Ansatz.

versibel (Tab. 17). Eine Vorinkubation des Enzyms mit dem SH-Gruppenprotektor, der selbst keinen Einfluß auf die Enzymaktivität hatte (s. 3.5.4.4.), war dabei ohne Bedeutung. Auch die Hemmung des Enzyms durch N-Äthylmaleimid konnte durch Glutathion unter bestimmten Bedingungen vollständig verhindert

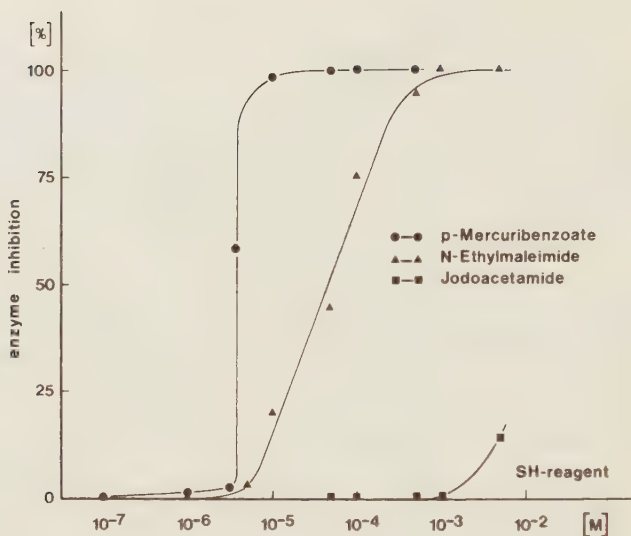


Abb. 20 Hemmung teilgereinigter HMT aus der Antrumschleimhaut des Schweines durch SH-Reagenzien

Die Enzymaktivität in Abwesenheit des Inhibitors wurde gleich 100% gesetzt und war 3,5 nmol 1(τ)-Methylhistaminbildung/ (minxmg Protein). Mittelwerte aus 4-8 Bestimmungen. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

werden (Tab. 17). Bei 10 min Vorinkubation von 10^{-3} M Glutathion, 10^{-4} M N-Athylmaleimid und Enzym kam es sogar zu einer starken Zunahme der Enzymaktivität, die bisher nicht erklärt werden kann (Tab. 17). Wurde dagegen das Enzym 30 min lang mit N-Äthylmaleimid vorinkubiert, so konnte weder mit 10^{-4} noch mit 10^{-3} M Glutathion eine teilweise Aufhebung der Hemmung der HMT erreicht werden.

3.5.4.4. Aktivierung der HMT durch SH-Gruppen schützende Substanzen

Durch SH-Gruppen schützende Substanzen trat im ganzen geprüften Konzentrationsbereich keine Hemmung, sondern nur

SH-Reagenz [μ M]	Relative Enzymaktivität in Gegenwart von SH-Reagenzien und Glutathion %				
	ohne GSH	mit GSH		mit GSH	
		10^{-3} M	10^{-4} M	10^{-3} M	10^{-4} M
Vorinkubation bei 0°C	p-MB+HMT 10 min	p-MB+GSH+HMT 10 min		1. p-MB+HMT 30 min 2. p-MB+HMT+GSH 10 min	
p-MB 10	0	100	100	120	104
p-MB 5	0	100	-	109	-
p-MB 1	97	-	100	-	100
NEM 1000	0	62	-	0	-
NEM 100	19	166	78	21	7
NEM 10	63	-	102	-	48

Tab. 17 Reversibilität der durch p-Hydroxymercuribenzoat (p-MB) und N-Äthylmaleimid (NEM) bewirkten Hemmung der HMT durch Glutathion (GSH)

Mittelwerte aus 2-4 Bestimmungen. Enzymaktivität ohne Inhibitorzusatz = 100%. "-" bedeutet "nicht bestimmt".
Spez. Akt. des Enzyms 3,52 nmol/(min x mg Protein);
55 μ g Protein/Ansatz. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

eine Aktivitätssteigerung auf (Tab. 18). Der Wirkungsmechanismus entsprach dabei dem bereits unter 3.5.4.2.2. dargestellten. Mit 33% war Dithioerythrit (30) der stärkste "Aktivator", während Glutathion praktisch keinen Effekt aufwies. Möglicherweise beruht aber die Aufhebung der Hemmung von N-Äthylmaleimid durch Glutathion bei gleichzeitiger Erhöhung der Enzymaktivität (s. 3.5.4.3.) auf einem ähnlichen Effekt wie die Aktivierung durch die übrigen Thiole. Die Abnahme der aktivierenden Wirkung von L-Cystein in höheren Konzentrationen könnte einer Interaktion der Substanz mit dem Enzym entsprechen, wie sie bei H_1 -Rezeptorantagonisten regelmäßig ange-
troffen wird (s. 3.5.4.7.).

SH-Gruppen Protektor	Relative Enzymaktivität [%] bei einer Thiolkonzentration [M] von					
	10^{-2}	5×10^{-3}	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-5}
Dithioerythrit	132	133	119	116	100	100
2-Mercaptoäthanol	124	118	116	102	100	100
L-Cystein	100	100	109	117	122	115
Glutathion (reduz.)	100	104	106	101	100	100

Tab. 18 Einfluß von SH-Gruppen-Protektoren (Thiole) auf die
HMT-Aktivität

Mittelwerte aus 2-6 Bestimmungen. Inkubationsansätze ohne SH-Gruppen schützende Substanzen enthielten 100% Enzymaktivität. Spez. Akt. $3,52 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg Protein})$; $55 \mu\text{g Protein}/\text{Ansatz}$. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

3.5.4.5. Hemmung der HMT durch Metallionen

Der Einfluß verschiedener Salze und von EDTA auf die Aktivität der HMT aus Schweineantrumucosa sind in Tab. 19 dargestellt. Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} und Co^{2+} waren starke Hemmstoffe des Enzyms, während Fe^{3+} nur noch eine schwache und Alkali- und Erdalkalitionen keine Beeinflussung der Enzymaktivität zeigten. Eine erhöhte HMT-Aktivität durch NaCl, wie sie von anderen Autoren (81) für das Enzym aus Meerschweinchenhirn beschrieben wurden, konnten nicht festgestellt werden.

EDTA in 10^{-2} M Konzentration hemmte das Enzym und zeigte im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich keine Steigerung der Enzymaktivität.

3.5.4.6. Hemmung der HMT durch die Antimalariamittel Amodiachin und Chlorochin

Amodiachin war der stärkste getestete Inhibitor der HMT aus menschlicher und Hundecorpusmucosa und aus Schweineantrum (Abb. 21). Bei dem Enzym aus Schweinemagen war der ID_{50} -Wert eine Zehnerpotenz kleiner als bei Mensch und Hund. Rohhomogenat und gereinigtes Enzym wurden durch Amodiachin in gleichem

Salz	% Hemmung bei einer Salzkonzentration [M] von						ID ₅₀ M
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
MgCl ₂	-	0	0	0	0	-	-
CaCl ₂	-	9	0	0	0	-	-
SrCl ₂	-	8	0	0	0	-	-
BaCl ₂	-	0	0	0	0	-	-
MnCl ₂	-	9	0	0	0	-	-
FeCl ₂	-	0	0	0	0	-	-
FeCl ₃	-	89	4	0	0	-	5,0x10 ⁻³
CoCl ₂	-	90	88	66	9	-	6,3x10 ⁻⁵
NiCl ₂	-	100	96	44	0	-	1,5x10 ⁻⁴
CuCl ₂	-	100	100	97	51	2	1,0x10 ⁻⁵
ZnCl ₂	-	69	35	28	0	-	1,3x10 ⁻⁴
KCl	0	0	0	0	-	-	-
NaCl	0	0	0	0	-	-	-
NaJ	0	0	0	0	-	-	-
Na ₂ SO ₄	0	0	0	0	-	-	-
EDTA	-	22	9	3	0	-	-

Tab. 19 Einfluß einiger Salze auf die Aktivität der HMT

Mittelwerte aus 4-6 Bestimmungen. Spez. Akt.

2,35 nmol/(minxmg Protein); 50 µg Protein/Ansatz.
Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

Maße gehemmt, da der ID₅₀-Wert für die HMT nach Chromatographie an DEAE-Cellulose $2,5 \times 10^{-6}$ M war (vgl. Abb. 21).

Chlorochin zeigte sowohl gegenüber dem Rohhomogenat als auch gegenüber der durch Chromatographie an DEAE-Cellulose teilgereinigten Enzympräparation die gleichen Hemmeffekte (Abb. 22). Der ID₅₀-Wert war mit $1,0 \times 10^{-5}$ M für beide Enzympräparationen fast eine Zehnerpotenz größer als der bei der Hemmung durch Amodiachin gefundene.

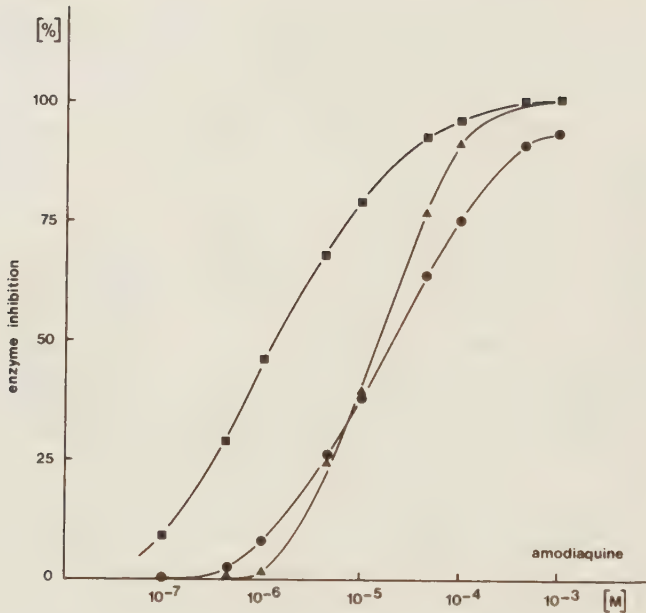


Abb. 21 Hemmung der HMT aus der Magenschleimhaut von Mensch (▲—▲), Hund (●—●) und Schwein (■—■) durch Amodiachin

Die Enzymaktivität in Abwesenheit des Inhibitors wurde gleich 100% gesetzt und war 0,3 nmol 1(T)-Methylhistaminbildung/(min x mg Protein) beim Schwein, 0,25 nmol/(min x mg Protein) beim Hund und 0,1 nmol/(min x mg Protein) beim Menschen. Mittelwerte aus 3 Bestimmungen. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

3.5.4.7. Hemmung und Aktivierung der hMT durch Histamin- H_1 - und Histamin- H_2 -Rezeptorantagonisten

3.5.4.7.1. Hemmung und Aktivierung der hMT durch H_1 -Rezeptorantagonisten und verschiedene Phenothiazine

Die HMT aus Schweineantrum mucosa wurde durch klassische Antihistaminika (H_1 -Rezeptorantagonisten (5)) in hohen Konzentra-

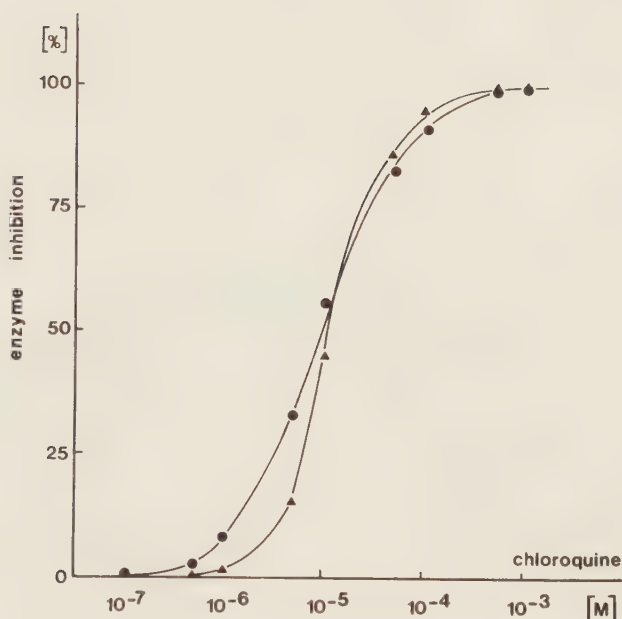


Abb. 22 Hemmung des Rohhomogenates (▲—▲) und der teilgereinigten (●—●) HMT aus der Antrumschleimhaut des Schweines durch Chlorochin

Die Enzymaktivität in Abwesenheit des Inhibitors wurde gleich 100% gesetzt und war 0,35 nmol 1(ℓ)-Methylhistaminbildung / (min x mg Protein) im Rohhomogenat und 3,8 nmol / (min x mg Protein) in der teilgereinigten Präparation. Mittelwerte aus 3 Bestimmungen. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

tionen gehemmt, durch niedrige Konzentrationen jedoch aktiviert (Abb. 23, 24, 25).

Auf Grund dieses mehr oder weniger ausgeprägten charakteristischen Verhaltens konnten die 18 untersuchten Antihistaminika in vier verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

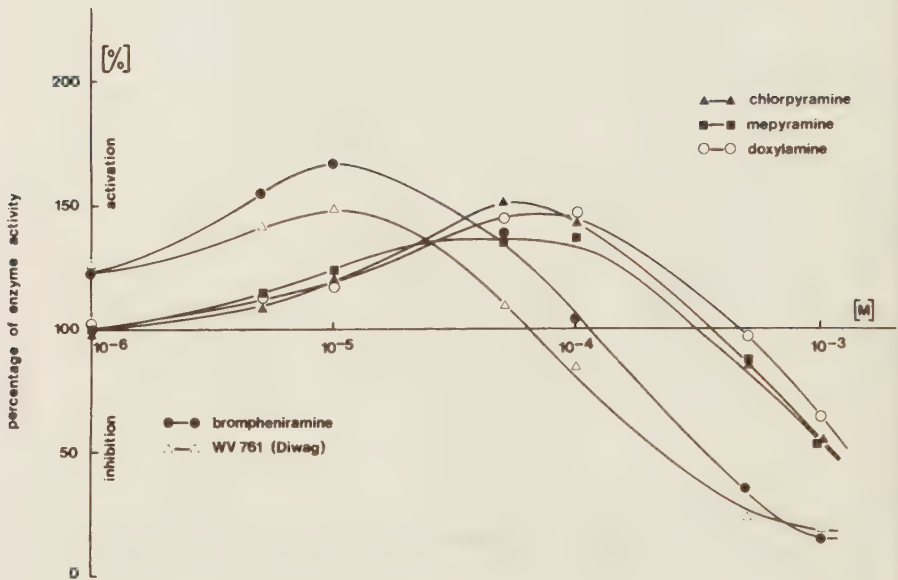


Abb. 23 Hemmung und Aktivierung der HMT durch H_1 -Rezeptor-antagonisten

Gruppe 1 und 2 gemäß den Definitionen im Text. Enzymaktivität ohne Zugabe der Antihistaminika gleich 100%. Mittelwerte aus 2 Bestimmungen. Spez. Akt. $4,04 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg Protein})$; $49 \mu\text{g Protein/Ansatz}$. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

Die erste Gruppe (Abb. 23) bestand aus D,L-Brompheniramin und WV 761 (Diwag). Diese beiden Substanzen waren die stärksten Hemmstoffe ($ID_{50} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$) und auch gute Aktivatoren des Enzyms (60% bei $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$).

Die zweite Gruppe war Chlorpyramin, Mepyramin und Doxylamin (Abb. 23). Sie zeigte eine geringere Steigerung der Enzym-

aktivität (40% bei $7,5 \times 10^{-5} \text{M}$) als die erste Gruppe und nur eine schwache Hemmung des Enzyms ($\text{ID}_{50} = 1,0 \times 10^{-3} \text{M}$).

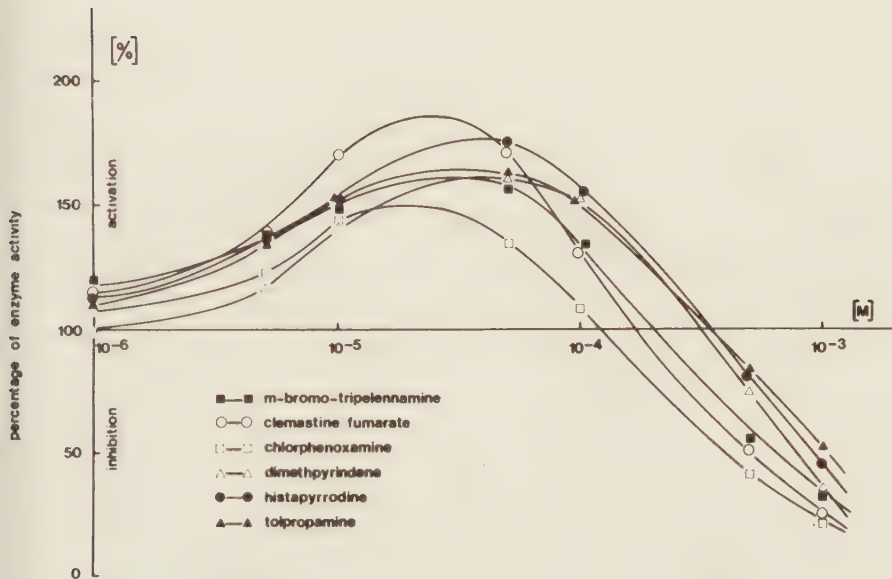


Abb. 24 Hemmung und Aktivierung der HMT durch H_1 -Rezeptor-antagonisten

Gruppe 3 gemäß den Definitionen im Text. Weitere Einzelheiten s. Legende von Abb. 23.

Die Substanzen der dritten Gruppe (Abb. 24) aktivierten die HMT um 50-80% ($5,0 \times 10^{-5} \text{M}$), waren aber schwächere Hemmstoffe als die erste Gruppe (ID_{50} bei $5,0 \times 10^{-4} \text{M}$).

Die vierte Gruppe schließlich (Abb. 25) zeigte keine oder nur eine sehr schwache Inhibition des Enzyms, die Aktivierung dagegen war sehr stark ausgeprägt. Im Falle des Piprinhydriats erreichte sie sogar 160%.

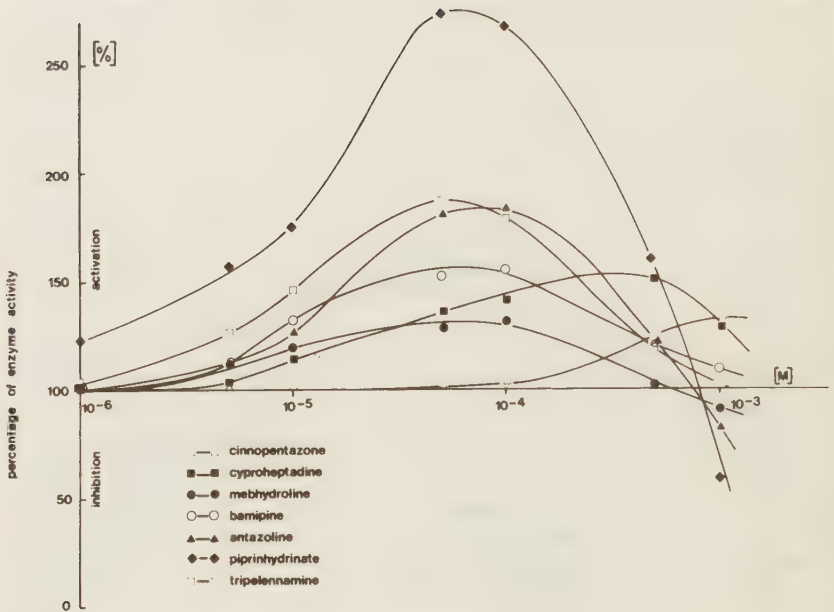


Abb. 25 Hemmung und Aktivierung der HMT durch H_1 -Rezeptor-antagonisten

Gruppe 4 gemäß den Definitionen im Text. Weitere Einzelheiten s. Legende von Abb. 23.

Auch 15 Phenothiazine, die alle mehr oder weniger als Antihistaminika (H_1 -Rezeptorantagonisten) wirkten, zeigten das Phänomen einer Aktivierung und Hemmung der HMT (Tab. 20). Die Hemmung war sogar stärker als bei den anderen Antihistaminika: Homophenazin und Perazin hatten ID_{50} -Werte von $1,7 \times 10^{-4} M$, Trifluoperazin, Pecazin und Hö 467 solche von $3,3 \times 10^{-4} M$. Mit den meisten Phenothiazinen wurde eine 50%ige Hemmung der HMT durch $5,0 \times 10^{-4} M$ oder höhere Konzentrationen erzielt. Die Aktivierungen des Enzyms waren nicht so ausgeprägt wie bei den meisten anderen Antihistaminika vom H_1 -Typ.

Substanz	% Enzymaktivität bei einer Substanzkonzentration [M] von						
	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}	5×10^{-6}	10^{-6}
Homophenazin	0	0	83	128	-	-	-
Perazin	0	7	88	135	-	-	-
Pecazin	0	24	124	143	-	-	-
Hö 467 (Bayer)	4	17	101	131	163	170	122
Trifluperazin	8	28	124	151	-	-	-
Triflupromazin	11	53	119	122	-	-	-
Alimemazin	12	48	126	152	168	153	120
Promethazin	18	37	105	132	135	121	100
Chlorpromazin	22	52	107	135	145	133	100
Hö 505 (Bayer)	9	81	132	130	112	104	100
Isothipendyl	27	49	117	143	138	129	107
Hö 482 (Bayer)	32	63	137	157	152	141	113
Fluphenazin	50	121	136	121	-	-	-
Propericiazin	89	133	155	149	119	115	110
Perphenazin	138	144	132	120	-	-	-

Tab. 20 Hemmung und Aktivierung der HMT durch Phenothiazine

Enzymaktivität ohne Zugabe von Phenothiazinen gleich 100%. Mittelwerte aus 2-3 Bestimmungen. Spez. Akt. $4,04 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg Protein})$; $49 \text{ } \mu\text{g Protein/Ansatz}$. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

Auch im Rohhomogenat wurde die HMT aus Menschen- und Schweine-
magen durch das Phenothiazin Chlorpromazin im gleichen Maße
gehemmt und aktiviert wie das angereicherte Enzym aus Schwe-
neantrumucosa.

Wurde für 6 der 33 untersuchten Antihistaminika der Hemmtyp
für das Enzym aus Schweineantrum untersucht, so konkurrierten
in allen Fällen die Substanzen mit Histamin kompetitiv um
das Enzym (Abb. 26). Die Erhöhung der Enzymaktivität war, wie
bereits unter 3.5.4.2.2. beschrieben, nicht auf eine Erhöhung
von v_{max} , sondern auf eine teilweise Aufhebung der Substrat-

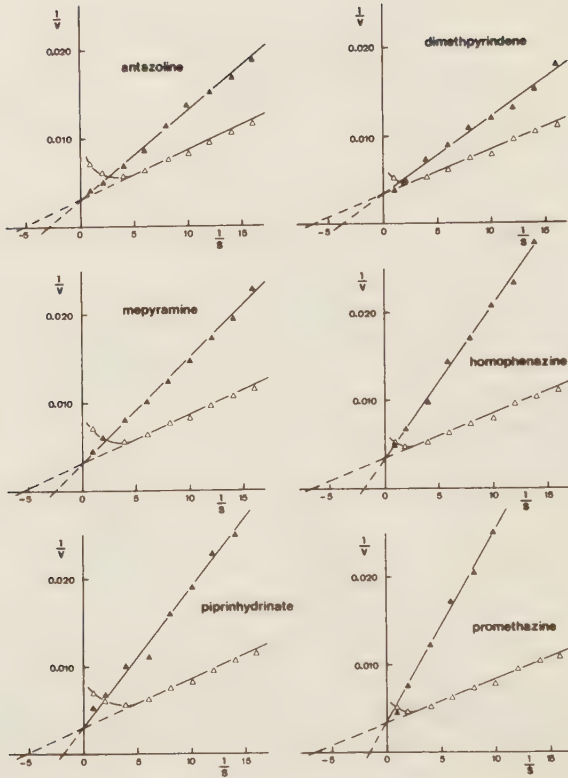


Abb. 26 Lineweaver-Burk-Diagramme der H₁-T-Aktivität bei verschiedenen Histamin-Konzentrationen mit (▲—▲) und ohne (△—△) Zugabe verschiedener H₁-Rezeptorantagonisten

v [pmol/min]; s [$10^{-4}M$]. Die Endkonzentrationen der einzelnen Inhibitoren war $1,0 \times 10^{-4}M$. Die Regressionsgeraden wurden im linearen Bereich nach der Gleichung $y = ax + b$ berechnet. Der Korrelationskoeffizient war in allen Fällen für beide Wertegruppen (mit und ohne Antihistaminikum) $< 0,98$. Spez. Akt. $4,04$ nmol/(min $\times$ mg Protein); 49 μg Protein/Ansatz.

hemmung durch "optimale" Mengen Histamin im Inkubationsansatz zu erklären (Abb. 26).

3.5.4.7.2. Hemmung und Aktivierung der HMT durch H_2 -Rezeptorantagonisten und durch 5-Methylburimamid

Gemäß den Definitionen von Ash und Schild (5) ist Burimamid der erste H_2 -Rezeptorantagonist, der nach langer Suche entdeckt werden konnte (18). Diese Substanz war ein guter Hemmstoff der HMT aus Schweinemagen. Mit einem ID_{50} -Wert von $1,6 \times 10^{-4} M$ lag sein Hemmeffekt im Bereich dessen von Phenthiazinen, die ja unter den H_1 -Rezeptorantagonisten die besten Hemmstoffe darstellten. Burimamid unterschied sich jedoch von allen anderen Histaminrezeptorblockern dadurch, daß es im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich von $1,0 \times 10^{-7}$ bis $2,0 \times 10^{-3} M$ diese Enzymaktivität nicht steigerte (Abb. 27). So wirkte Burimamid nicht nur auf einen Histaminrezeptor, der sich vom klassischen H_1 -Typ unterschied, sondern hatte auch auf die durch HMT katalysierte Methylierung eine von allen H_1 -Rezeptorantagonisten verschiedene Wirkung. Auch der Mechanismus der Inhibierung des Enzyms war verschieden von dem für die H_1 -Rezeptorantagonisten gezeigten: Gegen Histamin war die Hemmung eine Mischung aus nicht- und unkompetitiver Hemmung (Abb. 28).

Damit war die Frage aufgeworfen, ob H_2 -Rezeptorantagonisten auf die HMT grundsätzlich anders wirkten als die H_1 -Rezeptorantagonisten. So wurde Metiamid, der zweite bisher bekannte und am H_2 -Rezeptor im Vergleich zu Burimamid um eine Zehnerpotenz wirksamere H_2 -Rezeptorantagonist (19) zu den Inkubationsansätzen mit HMT zugegeben. Wie man aus Abb. 27 ersieht, aktivierte und hemmte Metiamid das Enzym wie ein H_1 -Rezeptorantagonist. Der ID_{50} -Wert war mit $2,2 \times 10^{-3} M$ eine Zehnerpotenz höher als bei Burimamid, während eine Konzentration von $1,0 \times 10^{-4} M$ die Enzymaktivität um 80% steigerte. Die Hemmung gegen Histamin war vom gleichen kompetitiven Typ, wie er schon für alle H_1 -Rezeptorantagonisten gefunden wurde (Abb. 28).

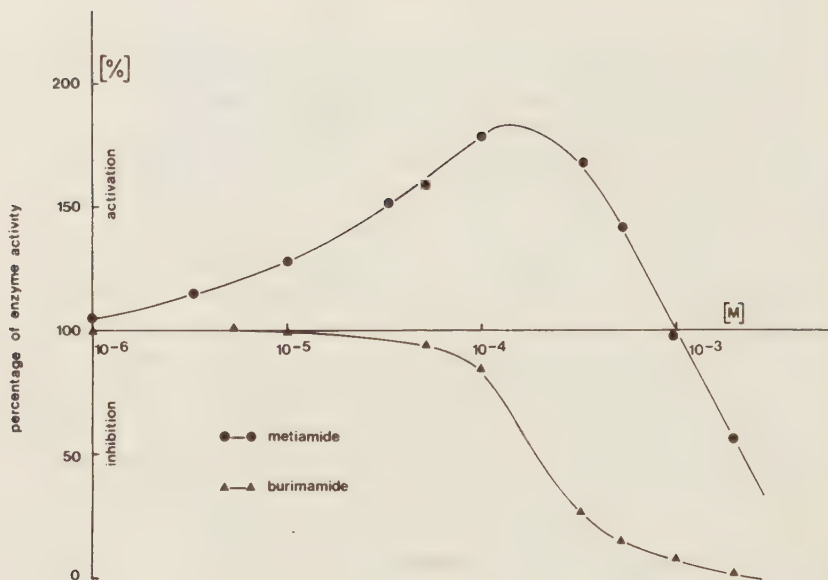


Abb. 27 Hemmung und Aktivierung der HMT durch die H_2 -Rezeptor-antagonisten Burimamid und Metiamid

Enzymaktivität ohne Zugabe der H_2 -Rezeptorantagonisten gleich 100%. Mittelwerte aus 3 Bestimmungen. Spez. Akt. 3,82 nmol/(min x mg Protein); 55 μ g Protein/Ansatz. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

Abb. 29 zeigt, daß das Lineweaver-Burk-Diagramm für die Aktivierung wieder die unter 3.5.4.2.2. gegebene Erklärung liefert: Nicht eine Erhöhung von $v_{\max}$, sondern eine teilweise Aufhebung der durch Histamin bewirkten Substrathemmung der HMT ist für die erhöhte Enzymaktivität verantwortlich.

Die unterschiedliche Wirkung der beiden einzigen bisher bekannten H_2 -Rezeptorantagonisten veranlasste die Frage, wel-

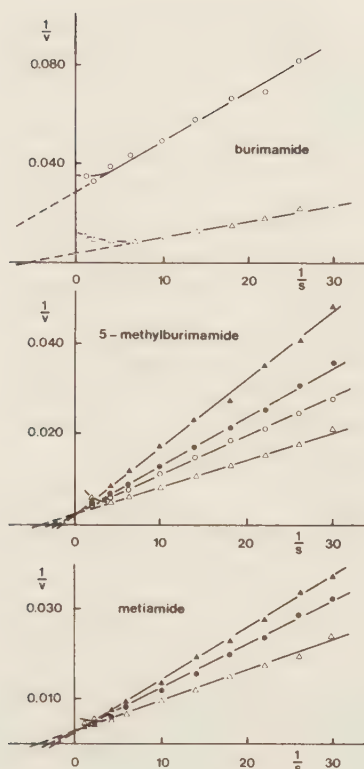


Abb. 28 Lineweaver-Burk-Diagramme der HMT-Aktivität bei verschiedenen Histamin-Konzentrationen mit und ohne Zugabe von Burimamid, 5-Methylburimamid und Metiamid
 v [pmol/min]; s [$10^{-4} M$]. ($\Delta-\Delta$) ohne Hemmstoff; Zugabe des Hemmstoffes in $0,66 \times 10^{-4} M$ ($\circ-\circ$), in $1,0 \times 10^{-4} M$ ($\bullet-\bullet$) und in $2,0 \times 10^{-4} M$ ($\blacktriangle-\blacktriangle$) Endkonzentration. Die Regressionsgeraden wurden im linearen Bereich nach der Gleichung $y = ax + b$ berechnet. Der Korrelationskoeffizient war in allen Fällen $< 0,98$. Mittelwerte aus 2 Bestimmungen. Spez. Akt. $4,04 \text{ nmol/}$ (min $\times$ mg Protein); $41 \text{ } \mu\text{g Protein/Ansatz}$.

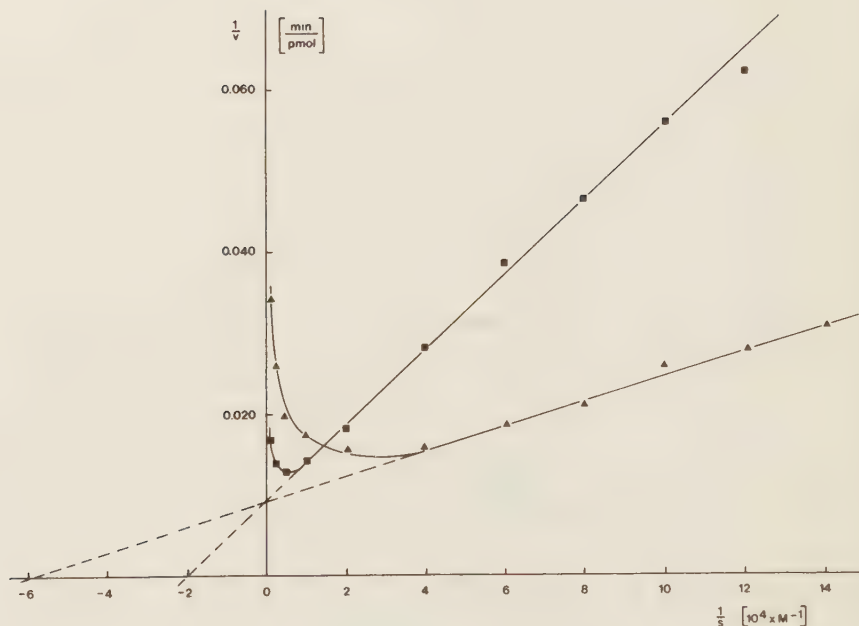


Abb. 29 Lineweaver-Burk-Diagramm der HMT-Aktivität bei verschiedenen Histamin-Konzentrationen mit (■—■) und ohne (▲—▲) Zugabe von $2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ Metiamid

Die Regressionsgerade wurde im linearen Bereich nach der Gleichung $y = ax + b$ berechnet. Der Korrelationskoeffizient war für beide Wertegruppen $r = 0,99$. Mittelwerte aus 2 Bestimmungen. Spez. Akt. $1,85 \text{ nmol}/(\text{min} \times \text{mg Protein})$; $42 \mu\text{g Protein}/\text{Ansatz}$. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1.1.

che Änderung im Molekülaufbau, der bei Metiamid und Burimamid sehr ähnlich ist (Abb. 3), zu dieser Änderung im Verhalten gegen die HMT geführt haben könnte: Die Substitution des Wasserstoffions in Position 5 des Imidazolrings durch eine Methylgruppe oder das Ersetzen einer Methylengruppe in der Sei-

tenkette durch ein Schwefelatom? Deshalb untersuchten wir den Effekt von 5-Methylburimamid (Abb. 3), das selbst keinen relevanten H_2 -Rezeptorantagonismus zeigt (22), auf die HMT. Die Substanz trägt in Position 5 des Imidazolrings eine Methylgruppe und hat somit das gleiche Ringsystem wie Metiamid. 5-Methylburimamid zeigte eine ausgeprägte Ähnlichkeit mit Metiamid im Verhalten gegen die HMT: Es wurde sowohl eine Hemmung als auch eine Aktivierung des Enzyms beobachtet, der ID_{50} -Wert war $1,6 \times 10^{-3}M$, die höchste Aktivierung des Enzyms (40%) wurde bei $1,0 \times 10^{-4}M$ beobachtet und auch der Hemmtyp gegen Histamin war der gleiche wie bei Metiamid (Abb. 28). So kann die verschiedene Wirkung der beiden H_2 -Rezeptorantagonisten auf die HMT aus Schweinemagen mit der Einführung der Methylgruppe in die Stellung 5 des Imidazolrings erklärt werden.

4. Diskussion

4.1. Stellung der HMT im Histaminstoffwechsel der Magenschleimhaut

Histamin in der Magenschleimhaut ist "in a preferred position to histamine brought to or liberated in the mucosa of other portions of the gastro-intestinal tract. It will not be destroyed by diamine oxidase in the gastric mucosa, a most propitious and economical circumstance" ^{+) (32)}. Tatsächlich wurde keine oder nur sehr geringe Aminoxidase (Pyridoxalphosphat enthaltend)-Aktivität in der Magenschleimhaut des Menschen und anderer Säugetiere gefunden (70, 157, 125, 52, 61, 152, 79, 80, 83, 78).

Allerdings kann die Folgerung aus dieser Tatsache nicht mehr länger aufrechterhalten werden, da hohe Aktivitäten von HMT

^{+) "}... in einer bevorzugten Position gegenüber dem Histamin, das zu anderen Teilen der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes transportiert oder dort liberiert wird. Es wird nämlich in der Magenschleimhaut nicht durch Diaminoxidase abgebaut, ein äußerst vorteilhafter und ökonomischer Umstand."

in der Magenschleimhaut vieler Säugetiere (25, 89, 78, 100, 9, 142) mit Ausnahme der Ratte (25, 78) gefunden wurden. Weiterhin wurden nach der Injektion von ^{14}C -Histamin im Hund relativ große Mengen ^{14}C -1(τ)-Methylhistamin und ^{14}C -1(τ)-Methylimidazolessigsäure in der Magenschleimhaut gefunden (49). White (159) konnte relativ viel endogenes 1(τ)-Methylhistamin im Magen der Katze nachweisen. Deshalb ist die HMT sehr wahrscheinlich das Enzym, das nicht nur in vitro, sondern auch in vivo das Histamin der Magenschleimhaut inaktiviert.

Die hohen Aktivitäten der HMT in der Fundus- und Corpus-schleimhaut passen zu der Hypothese, daß Histamin ein physiologischer Chemostimulator der Magensaftsekretion ist. Überraschend wurde aber bei Mensch, Schwein und Hund die höchste Aktivität im Antrum gefunden (vgl. 78), aber nicht bei der Katze und bei Nagern, bei denen immer der Magenanteil die höchste HMT-Aktivität enthielt, der auch die höchste Dichte an Parietalzellen aufwies (78). Lorenz et al. (97) wiesen darauf hin, daß Histamin nicht nur die exocrinen Drüsen stimuliert, sondern im Verdauungstrakt noch andere physiologische Funktionen hat. Da relativ hohe Konzentrationen an Histamin (93, 96, 97) und Histidindecaboxylase (94, 95) im Antrum des Menschen und vieler Säugetiere nachgewiesen wurden, könnte Histamin in den Freisetzungsmechanismus des Gastrins eingeschaltet sein. Histamin kann nämlich in der Hypophyse (65) und in den Inseln der Bauchspeicheldrüse (150) die Freisetzung von Peptidhormonen stimulieren.

4.2. Bestimmungsmethode der HMT-Aktivität

Eine Voraussetzung für den Nachweis einer physiologischen Funktion von Histamin und HMT beim Sekretionsprozeß der Belegzelle im Magen ist eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der Enzymaktivität. In dieser Hinsicht ließen die bisherigen Testverfahren (137, 117) viel zu wünschen übrig, weshalb eine ausführliche Überprüfung und Modifizierung dieser Methoden notwendig war.

Bei der Isotopenmethode fehlte bisher eine Darstellung der Reaktionskinetik und die Identifizierung von 1(τ)-Methylhistamin als Reaktionsprodukt.

Von den Inkubationsbedingungen erwies sich bei den genannten Autoren vor allem die Akzeptorsubstratkonzentration als weit unterhalb der Substratsättigung. Da aber endogenes Histamin in nahezu allen Organen (104) in sehr variablen Konzentrationen vorkommt, ist es ausgeschlossen, zuverlässige und vergleichbare Enzymaktivitäten ohne Kenntnis der tatsächlichen Substratkonzentration zu erhalten. Bei der von uns gewählten "optimalen" Substratkonzentration spielte aber der endogene Histamingehalt keine Rolle, weil in diesem Substratbereich die Enzymaktivität weitgehend unabhängig von der Substratkonzentration wird. Entsprechend lang verläuft deshalb auch die Reaktionskinetik linear.

Ein besonderes Problem bildete ferner die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der verwendeten Charge des markierten Donorsubstrates. Für Messungen von Tag zu Tag, wie sie z.B. bei größeren Versuchsserien an Biopsiematerial des Menschen notwendig werden, ist deshalb eine Qualitätskontrolle unerlässlich.

Ferner wurde nach der Methode von Snyder und Axelrod (137) die Enzymaktivität in cpm/h und g Gewebe angegeben. Die Extraktionsbedingungen und Zählausbeuten wurden aber bei diesen Testverfahren bisher keiner Kontrolle unterzogen, ihre Varianz innerhalb desselben Tages und von Tag zu Tag war nicht bekannt. Unter den in dieser Arbeit beschriebenen Bedingungen für die Inkubation und Extraktion wurde eine große Präzision für den Isotopentest erzielt, der seine Eignung für Reihenversuche in Biochemie und Klinischer Chemie ausdrücklich unter Beweis stellte (s. 3.1.1.4.). Zusätzlich wurde durch die verschiedenen Leerwerte die Richtigkeit des Verfahrens erhöht, die durch Verunreinigungen in SAM, die von Charge zu Charge variierten, erheblich beeinflusst werden kann.

Bei der fluorometrischen Methode fehlte bisher ebenfalls eine Darstellung der Reaktionskinetik. Die Enzympräparate (meist Rohextrakte) wurden mit Substraten und Aminoguanidin für eine definierte Zeit (meist 1 Stunde) inkubiert und die Abnahme der Histaminmenge im Ansatz nach dieser Zeit für die Berechnung der Enzymaktivität berechnet. Entsprechend wurden je nach Reaktionsverlauf in den einzelnen Ansätzen willkürliche Enzymaktivitäten erhalten, deren Bezug zum Enzymgehalt der Gewebe bereits infolge fehlender Teststandardisierung in keiner Weise gegeben war. Außerdem wurde ohne die Zugabe von Nicotinamid der nicht durch HMT katalysierte Histaminumsatz nicht weitgehend verhindert.

Bei dem Test nach Netter und Bodenschatz (117) wurde außerdem Histamin aus den Ansätzen nach Shore et al. (134) extrahiert. Mit diesem Verfahren war aber die Spezifität der Histaminbestimmung nicht gewährleistet, da z.B. auch Spermidin miterfaßt und nach Kondensation mit o-Phthaldialdehyd mitgemessen wurde. Für Gewebe und Tierspezies mit hohen Gehalten an Spermidin z.B. Gehirn und Meerschweinchen, kann deshalb das Verfahren nach Shore et al. (134) nicht verwendet werden. Die Isolierung von Histamin mittels Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50 ist hier das Mittel der Wahl für die spezifische Bestimmung des Amins.

Ebenso notwendig wie bei der Isotopenmethode war bei dem fluorometrischen Test die Wahl der optimalen Akzeptorsubstratkonzentration. Hier lag aber ein prinzipieller Nachteil dieses Verfahrens, da auch bei optimaler Histaminkonzentration im Ansatz die Umsätze an Substrat relativ gering waren (nur ca. 20%/h) und damit die Empfindlichkeit des Testes eingeschränkt wurde. Die Richtigkeit der Methode konnte aber durch den Vergleich mit der Isotopenmethode ebenso weitgehend abgesichert werden, wie auch die Präzision mit Hilfe einer entsprechenden Zahl von Haupt- und Leerwerten den Bedingungen genügte, die heute an einen Enzymtest gestellt werden (Vari-

ationskoeffizient $< 10\%$, (16)). Mit einem Variationskoeffizienten von nahezu 20% war dies für die Methode nach Netter und Bodenschatz (117) nicht der Fall.

Der Vergleich von Isotopenmethode und fluorometrischer Methode erhöhte nicht nur die Richtigkeit der Bestimmung der HMT-Aktivität, sondern jedes der beiden Verfahren hatte auch für sich selbst seine besonderen Vorzüge.

Die Isotopenmethode ist wegen ihrer hohen Empfindlichkeit das Verfahren der Wahl für die Bestimmung der HMT-Aktivität.

Die fluorometrische Methode ist aber empfindlicher als die Isotopenmethode, wenn der Nachweis geringer Histaminmengen benötigt wird. Dies trifft vor allem für die spezifische Bestimmung von äußerst geringen Histaminkonzentrationen in Körperflüssigkeiten zu. So waren wenigstens 10 ng Histamin notwendig, um in Ansätzen mit HMT und ^{14}C -SAM cpm-Werte zu erhalten, die doppelt so hoch waren wie in den Blanks. 0,5 ng Histamin genügten aber bei der fluorometrischen Methode, um die Methylierung des Amins noch anhand des Verschwindens der histamin-o-phthaldialdehydbedingten Fluoreszenz bestimmen zu können. Damit ist gegenwärtig die Inaktivierung einer Substanz durch HMT, gemessen im fluorometrischen Test, wegen der hohen Substratspezifität des Enzyms die am meisten spezifische und zuverlässige Methode für die Identifizierung von Histamin im Picogramm- bzw. Femtomolbereich (106). Hiermit war es erstmals möglich, eine patho-physiologische Funktion von Histamin im Menschen bei Narkosezwischenfällen, Operationen und Reaktionen auf Blutersatzmittel nachzuweisen (99, 106, 107), und sehr wahrscheinlich lassen sich hierdurch auch in naher Zukunft physiologische Funktionen von Histamin im tierischen und menschlichen Organismus endlich aufklären (109).

4.3. Reinigung der HMT aus Schweineantrum mucosa

Die in dieser Arbeit erreichte Reinigung der HMT aus Schweinemagen, die maximal eine Anreicherung um das 126fache er-

brachte, kann sicherlich den präparativ tätigen Biochemiker noch nicht ganz befriedigen. Dies war auch der Grund, warum die vielen Versuche mit verschiedenen anderen Reinigungsschritten im Detail beschrieben wurden. Die Instabilität des Enzyms und die damit zusammenhängenden hohen Verluste an Ausbeute waren in erster Linie dafür verantwortlich, daß eine größere Anreicherung nicht in jederzeit reproduzierbarer Weise erreicht werden konnte. Die unter 2.1.2.4. beschriebene, routinemäßig durchgeführte Anreicherung der HMT aus Schweineantrum war dagegen zuverlässig durchzuführen und erzielte bei etwa 30facher Anreicherung eine hohe Ausbeute an Gesamtaktivität.

Die in dieser Arbeit beschriebene Anreicherung des Enzyms stellt die erste Reinigung der HMT aus einer Magenschleimhaut dar, dem für die Physiologie des Histamins bis heute wichtigsten Gewebe im Organismus. Aus anderen Organen, vor allem aus Gehirn und Leber, wurde das Enzym bereits von verschiedenen Autoren angereichert, doch fällt allgemein der schlechte Grad der Anreicherung auf. Brown et al. (25, 26) erzielten nur eine 30fache Anreicherung des Enzyms aus Meerschweinchenhirn und nur eine 8fache aus Mäuseleber, Lindahl (87) eine 5-16fache Anreicherung aus Schweineleber, Snyder et al. (138) nur eine 6fache aus Meerschweinchenhirn, Merrill et al. (113) eine 7fache aus Meerschweinchenhirn und Taylor und Snyder (141) eine 6fache aus Mäusehirn.

Nur zwei Arbeitsgruppen erzielten bisher eine bessere Anreicherung der HMT:

1. Thithapandha (143, 144) reinigte das Enzym aus Meerschweinchenhirn 200fach. Diese relativ hohe Gesamtanreicherung beruhte aber vor allem darauf, daß eine 12 stündige Zentrifugation bei 225.000 g eine 11fache Anreicherung des Enzyms erbrachte. Ein solches Verfahren läßt sich nicht regelmäßig durchführen.

2. Gustafsson und Forshell (59) reinigten das Enzym aus Schweineleber 260fach. Dabei waren vor allem die Fällung mit Äthanol

(4,8fache Anreicherung) und die Chromatographie an DEAE-Cellulose (20fache Anreicherung!) besonders erfolgreiche Verfahrensschritte. Wie unter 3.4.3. beschrieben wurde, erbrachte aber die Alkoholfällung für das Enzym aus Magenschleimhaut keine Anreicherung. Auch wurde eine so hohe Anreicherung mit DEAE-Cellulose wie bei diesen Autoren weder von uns noch von Thithapandha (144) erreicht, der mit derselben Technik wie Gustafsson und Forshell (59) "nur" eine 10,3fache Anreicherung erzielte.

Auffällig erscheint aber bei den beiden genannten Arbeitsgruppen, daß auch sie ihre Untersuchungen über die Eigenschaften der HMT nicht mit den am höchsten gereinigten Enzympräparaten durchführten, sondern teilweise sogar mit Rohhomogenaten nach Ultrazentrifugation arbeiteten (145, 146). Offensichtlich waren die Einzelschritte der Reinigung nicht ohne Mühe zu reproduzieren, so daß für die zahlreichen notwendigen Inkubationen auf Enzympräparate mit geringerer Anreicherung zurückgegriffen werden mußte. Faßt man deshalb alle Ergebnisse über die Eigenschaften der HMT bei den genannten Autoren und in dieser Arbeit zusammen, so wurden sicherlich die letzteren mit dem bisher am höchsten angereicherten Enzym erhalten. Da zudem die spezifische Aktivität der HMT im Magengewebe bereits im Rohhomogenat 5-10fach höher war als im Meerschweinchenhirn und in der Schweineleber, wiesen unsere 25-30fach angereicherten Enzympräparate bereits dieselbe spezifische Aktivität auf wie die am höchsten angereicherten Enzympräparate dieser Autoren (59, 143, 144).

4.4. Vergleich der enzymatischen Eigenschaften der HMT aus Schweinemagenmucosa mit den Ergebnissen der HMT aus anderen Organen

Ein Vergleich der K_m -Werte für SAM zwischen der HMT aus Schweinemagen und der aus anderen Organen (vgl. Tab. 3) ergibt in zahlreichen Fällen, einschließlich der HMT aus Schweinemagen ($0,87 \times 10^{-5}M$) eine gute Übereinstimmung. Der Wert für die K_m liegt um $1,0 \times 10^{-5}M$. Lediglich für das Enzym aus Mäuserhirn (146) und aus Meerschweinchenhirn (25) werden Werte

von $3,0 \times 10^{-5}M$ und $38 \times 10^{-5}M$ angegeben. Diese Werte erscheinen aber insofern etwas zweifelhaft, als sie die einzigen sind, die über den entsprechenden K_m -Werten für Histamin liegen. Es werden nämlich aus theoretischen Gründen K_m -Werte für SAM erwartet, die kleiner als die für Histamin sind, da Methyltransferasen generell eine größere Affinität zum Donor- als zum Akzeptorsubstrat besitzen (40). Hinzu kommt, daß 11 verschiedene Untersucher diese Hypothese auch experimentell bestätigen konnten (Tab. 3).

Ein Vergleich der K_m -Werte für Histamin zeigt nach Tab. 3 eine große Ähnlichkeit des Enzyms aus Schweinemagen ($K_m = 1,71 \times 10^{-5}M$) mit fast allen HMT-Präparationen aus anderen Organen. Lediglich die Enzyme aus Katzen- und Menschenleber zeigen mit K_m -Werten von $8,1 \times 10^{-5}M$ (9) und $10 \times 10^{-5}M$ (87) erheblich höhere Werte. Der letztere Wert konnte durch Gustafsson und Forshell (60) allerdings nicht bestätigt werden. In einem ganz anderen Konzentrationsbereich lag eines der von Axelrod und Vessell (9) beschriebenen Isoenzyme der HMT, dessen K_m -Wert für Histamin $95 \times 10^{-5}M$ betrug.

Hinsichtlich der Substratspezifität der HMT mußte nun die Ansicht der absoluten Substratspezifität des Enzyms (25) aufgegeben werden. N'-Methylhistamin wurde als zweites, natürlich vorkommendes Substrat der HMT gefunden. Da das Enzym nun mehr eine hohe, aber keine absolute Substratspezifität besitzt, und da das zweite Substrat N'-Methylhistamin im Magengewebe (33) und im Magensaft, Blut und Urin vorkommt (76), kann die enzymatische Doppelisotopenbestimmungsmethode für Histamin (138) nur dann als spezifisch angesehen werden, wenn mit ausreichender Sicherheit gezeigt wurde, daß das Inkubationsgemisch frei von N'-Methylhistamin war. Für die Bestimmung von Histamin im Plasma ist dies von ausschlaggebender Bedeutung, da bei der fluorometrischen Messung von Histamin N'-Methylhistamin nicht stört. Es ergibt im Ansatz mit o-Phthaldialdehyd keine Fluoreszenz (106). Damit ist gegenwärtig die fluorometrische Methode zur Bestimmung von Histamin im Plasma der mit der Isotopenmethode überlegen.

4.5. Reaktionsmechanismus der HMT und Bindung von SAM bzw.

SAH an das Enzymprotein

Über den Mechanismus der Methylierung des Histamins unter der Katalyse von HMT gab es bisher nur Angaben für eine ca. 200fach gereinigte (143, 144) und eine 6fach angereicherte (15) Präparation aus Meerschweinchenhirn, wobei einmal ein "Ping-Pong"-Mechanismus und einmal ein "random-sequential"-Mechanismus postuliert wurden. Trotz Zitierung einer richtigen Literaturstelle (27) wurden die Versuche von letzteren Autoren falsch interpretiert, da die gefundene kompetitive Hemmung des SAM und nicht-kompetitive Hemmung des Histamins durch SAH den Reaktionstyp als einen "ordered-sequential"-Mechanismus erkennen lassen (31).

Die unter 3.5.3. beschriebenen Versuche zeigten die Methylierung des Histamins auch unter Katalyse des Enzyms aus Schweinemagen als ein Beispiel eines "ordered-sequential"-Mechanismus an. Der gleiche "Sequential"-Reaktionsmechanismus wurde für die Catecholmethyltransferase (EC 2.1.1.6) (54, 55, 43), für die Phenyläthanolamin N-methyltransferase (EC 2.1.1) (38, 119) und für die Indoläthylamin N-methyltransferase (EC 2.1.1) (85) vorgeschlagen, was ein weiterer Hinweis auf die Ähnlichkeit der für die Transmethylierung verschiedener Gewebsamine verantwortlichen Enzyme ist. Die Unterschiede zu dem berichteten "Ping-Pong"-Mechanismus (143, 144) lassen sich nicht klären, da dieses Ergebnis nur in zwei Kurzabstracts berichtet wurde und somit nicht nachprüfbar war.

Hinweise für die Bindungsstellen des SAM an das Enzymprotein der HMT wurden durch die Versuche mit SAH und seinen Analogen erhalten. Die gegen SAM kompetitive Hemmung der HMT durch SAH ließ es naheliegend erscheinen, daß einige oder mehrere Bindungsstellen des SAH an das Enzym mit denen identisch waren, die Zappia et al. (160) für die Bindung des SAM vorgeschlagen hatten (Abb. 30). Auch könnte die stärkere Bindung des SAM bzw. des SAH und seiner Analogen (40) an das Enzym

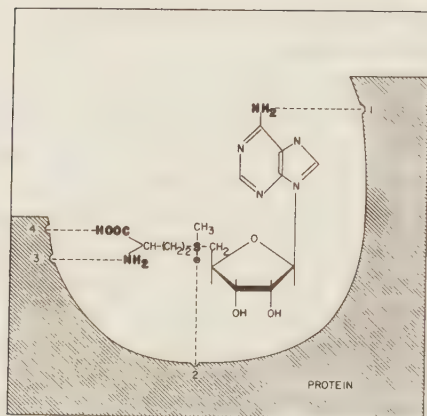


Abb. 30 Vorgeschlagene Bindungsstellen für SAM im aktiven Zentrum von Methyltransferasen (nach (160))

im Vergleich zu Histamin erste Hinweise über die Beschaffenheit des aktiven Zentrums der HMT geben.

1. Da alle inhibitorisch wirksamen SAH-Analogen gegenüber SAM rein kompetitive Inhibitoren waren, werden sehr wahrscheinlich die Hemmstoffe und das Substrat an dieselbe reaktive Gruppe im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden.

2. Von allen an der Seitenkette veränderten SAH-Analogen hemmte nur S-Adenosyl-D-homocystein und S-Adenosyl-L-cystein das Enzym. Somit scheint es wichtig, daß die an die 5'-Position der Ribose gebundene Seitenkette eine Aminosäuregruppe trägt und daß die Kettenlänge des Aminosäurerestes gleich der des SAM sein muß. Die starke Hemmung der HMT durch S-Adenosyl-D-homocystein scheint spezifisch für diese Transmethylierung, da eine Hemmung anderer Methyltransferasen durch diese Substanz nicht beobachtet werden konnte (23).

3. Durch den Austausch des Adenosinrestes in SAH gegen Guanosin nimmt das Hemmvermögen der Substanz nur unwesentlich ab, wäh-

rend S-Cytidyl-L-homocystein keinerlei Einfluß auf das Enzym hat. Dies zeigt an, daß bei dem Enzym aus Schweinemagen das Puringerüst mit der Anwesenheit eines nucleophilen Zentrums in Position 6 wichtig ist, unabhängig davon, ob es sich um eine Hydroxy- oder Aminogruppe handelt.

4. Da man annehmen kann, daß die pK_s -Werte für die 6-Aminogruppe des SAH und die 6-Methylaminogruppe des N⁶-Methyl-SAH ziemlich ähnlich sind (zum Vergleich: Adenin: $pK_s = 4,12$; N⁶-Methyladenin: $pK_s = 4,15$ (1)) muß der Unterschied in der Hemmung der HMT durch SAH, N⁶-Methyl-SAH und N⁶-Dimethyl-3-deaza-SAH eher auf die sterische Hinderung dieses nucleophilen Zentrums (s. oben) zurückgeführt werden als auf eine Änderung des pK_s .

5. Substitution des Stickstoffs in Stellung 3 der Adenosinbase durch Kohlenstoff erhöhte den ID₅₀-Wert um eine Zehnerpotenz. Das kann auf eine Änderung der Elektronegativität innerhalb des Ringsystems oder auf eine Aufhebung der Wechselwirkung zwischen diesem Stickstoff und dem Sauerstoff der Ribose, die die freie Rotation um die Glycosidbindung einschränkt, zurückzuführen sein. Eine Unterstützung für diese letztere Erklärung gibt der Befund, daß das Ersetzen des Sauerstoffatoms in der Ribose durch eine Methylengruppe die Hemmwirkung des SAH gegen die Catecholmethyltransferase ebenfalls völlig aufhebt (42).

Somit waren die von Zappia et al. (160) vorgeschlagenen Bindungsstellen 1, 3 und 4 für SAM an die HMT (Abb. 30) auch für SAH und dessen synthetische Analoge gültig, soweit man Position 3 und 4 als Einheit betrachtet. Die koordinative Bindung des SAH über das Schwefelatom (Bindung 2) wurde nicht untersucht, doch scheint eine Oxygenierung an diesem Schwefelatom - anders als bei der Catecholmethyltransferase (41) - einen starken Einfluß auf die Hemmwirkung des SAH zu haben, wie für die HMT aus Meerschweinchenhirn gezeigt wurde (23). Einen zusätzlichen Einfluß auf die Bindung des Gesamtmoleküls

scheint das Stickstoffatom in Stellung 3 der Purinbase zu haben. Welcher Art dieser Einfluß ist, konnte bisher nicht mit Sicherheit gezeigt werden.

HMT aus Schweinemagenmucosa reagierte sehr empfindlich auf SH-Reagenzien und Schwermetallionen. Die starke Hemmung durch p-Hydroxymercuribenzoat und Cu^{2+} -Ionen zeigte eine Mercaptidbildung mit einer SH-Gruppe im reaktiven Zentrum an (154). Diese SH-Gruppe könnte die Schlüsselfunktion bei der elektrostatischen Anziehung und Bindung des SAM am Molekül spielen (154). Bereits bei physiologischem pH-Wert (pH 7,4), wo die Gruppe teilweise ionisiert ($-\overset{\delta-}{\text{SH}}$) ist, kann sie eine Ionen-Ionen-Wechselwirkung mit dem positiv geladenen Sulfoniumion des SAM eingehen; bei höherem pH-Wert ist sie noch stärker ionisiert und kann somit SAM noch fester binden. Wird SAM durch S-S-Bindung am Enzym festgehalten, so ist der nucleophile Angriff auf seine Methylgruppe durch den Imidazolistickstoff des Histamins erleichtert. Histamin selbst könnte ebenso durch eine zweite partiell ionisierte SH-Gruppe ($\overset{\delta-}{\text{S}}$) gebunden werden, da es in der Seitenkette einen partiell ionisierten Amino-Stickstoff ($\overset{\delta+}{\text{N}}$) besitzt.

4.6. Hemmstoffe der HMT

Vergleicht man das Ausmaß der Hemmung der HMT aus Schweinemagen durch die in Tab. 14 genannten Hemmstoffe mit der Hemmung, die diese Stoffe bei den Enzymen aus Schweineleber (200fach gereinigt (59,60); 5-16fach (87)), Meerschweinchenhirn (30fach (25); 200fach (143); 6fach (15)), Rattenniere (Schnittpräparate (10); 1200 g-Überstand (117); 30.000 g-Überstand (35)) und Mäusehirn (6fach (140)) bewirken, so kann man eine nahezu vollständige Übereinstimmung feststellen. Lediglich das Enzym aus Schweineleber (60) wurde nur durch drei von acht gemeinsam mit der HMT des Magens untersuchten Stoffen vergleichbar gehemmt, während bei der Hemmung durch SH-Reagenzien, Metallionen und EDTA Unterschiede im ID_{50} -Wert von mehr als einer Zehnerpotenz auftraten.

Hieraus ergibt sich prinzipiell eine sehr starke Ähnlichkeit der Histaminmethyltransferasen verschiedenster Reinheit und verschiedenster Organherkunft.

Von den einzelnen Gruppen der Hemmstoffe sollen hier vor allem die SH-Reagenzien und die Schwermetallionen, die H_1 - und H_2 -Rezeptorantagonisten und die methylierten Histamine ausführlicher diskutiert werden.

SH-Reagenzien und Schwermetallionen: Daß die Hemmwirkung verschiedener SH-Reagenzien stark unterschiedlich sein kann, bedarf keiner besonderen Erwähnung, da diese Substanzen außer mit SH-Gruppen (im aktiven Zentrum und an anderen Stellen des Enzyms) noch mit anderen Gruppen reagieren können und auch bei einer Reaktion mit verschiedenen SH-Gruppen zusätzlich eine neue Seitenkette in das Enzym eingeführt wird. Die fehlende Hemmung durch Jodacetamid könnte so mit dem ungeladenen Molekülrest erklärt werden, der keinen Einfluß auf die Zugänglichkeit des reaktiven Zentrums für die Reaktionspartner hat (155).

Die Reversibilität der Enzymhemmung durch p-Hydroxymercuribenzoat und die Irreversibilität durch N-Äthylmaleimid sind häufig zu beobachten. Die HMT scheint durch die Mercaptidbindung nicht stark verändert zu werden, während die Addition von N-Äthylmaleimid die Struktur des Enzyms irreversibel verändert. Ist die Hemmung umkehrbar, dann geht sie schnell vonstatten, wobei nicht zu entscheiden ist, ob die schützende Substanz primär mit dem Enzym oder dem SH-Gruppen-Reagenz reagiert. Bei gleichzeitiger Zugabe von SH-Reagenz und SH-Protektor dürfte es sich einfach um eine Verminderung der tatsächlich wirksamen Menge an SH-Reagenz handeln.

H_1 - und H_2 -Rezeptorantagonisten: Die Untersuchung der Wirkung verschiedener H_1 -Rezeptorantagonisten auf die HMT aus Schweinemagen zeigte, daß alle das Enzym sowohl hemmten wie auch aktivierten. Die Ergebnisse für Tripelennamin, Antazolin, D,L-Brompheniramin, Dimethpyridin, Promethazin und Chlor-

promazin stimmten genau mit denen überein, die Taylor und Snyder mit dem Enzym aus Meerschweinchenhirn berichteten (140). Auch diese Autoren fanden eine Hemmung und Aktivierung des Enzyms durch diese Substanzen. Die Aktivierung des Enzyms durch H_1 -Rezeptorantagonisten blieb in früheren Untersuchungen unbemerkt, da für die Enzymaktivitätsbestimmungen Histamin-Konzentrationen verwendet wurden, die fast eine Zehnerpotenz unterhalb der "optimalen" Substratkonzentration lagen (25, 117, 37).

Im Gegensatz zu den Antihistaminika vom H_1 -Typ zeigten die Histamin H_2 -Rezeptorantagonisten Burimamid und Metiamid keine einheitliche Wirkung auf die HMT aus Magenschleimhaut. Diese Beobachtung kann auf zwei Weisen erklärt werden:

1. Metiamid enthält einen 5-Methylimidazolring. Wie für 5-Methylhistamin gezeigt (s. 3.5.4.2.1.) scheint diese Struktur eine kompetitive Hemmung der Magen-HMT zu bewirken. Die Ergebnisse mit 5-Methyl-Burimamid bestärkten diese Annahme, weil die Einführung einer Methylgruppe in Stellung 5 des Imidazolrings im Burimamidmolekül den Hemmtyp von dem für Burimamid beobachteten zu dem für Metiamid gefundenen ändert.
2. Der Hemmechanismus des Burimamid, der sich von dem aller anderen Histamin Rezeptorantagonisten unterscheidet, ist dem des 1(ζ)-Methylhistamins sehr ähnlich (s. Abb. 14 und Abb. 28). Burimamid hat einen Imidazolring wie Histamin und 1(ζ)-Methylhistamin, der in Stellung 4, aber nicht in Stellung 5 substituiert ist. Diese Konfiguration ist nur in Burimamid und in keinem der anderen 35 untersuchten Antihistaminika vorhanden. So könnte der Typ der Hemmung der HMT durch Burimamid dieser Ähnlichkeit mit dem Substrat oder dem Produkt der Methylierung zugeschrieben werden. Ähnliche Hemmechanismen wurden bei der Produkthemmung der Catecholmethyltransferase durch Metanephrin (55) und durch 2-Methoxyöstradiol-17 β und 2-Hydroxyöstradiol-17 β 3-Methyläther (12) beobachtet.

Das bemerkenswerte an dem Befund der Hemmung der HMT durch Antihistaminika erscheint aber, daß jeder Stoff, der antihistamine Eigenschaften sowohl gegen den H_1 - wie gegen den H_2 -Rezeptor zeigt, auch die Aktivität der HMT beeinflusst. Es müssen also strukturelle Ähnlichkeiten zwischen dem aktiven Zentrum des Rezeptors und des Enzyms bestehen, so wie sie beim Acetylcholinrezeptor und bei der Acetylcholinesterase (EC 3.2.2.7) vorkommen. Eine weitere Parallelität zur Ähnlichkeit der reaktiven Zentren eines Rezeptors und eines Enzyms ist auch darin zu sehen, daß, - ähnlich wie die Antihistaminika die HMT - der Acetylcholin-Rezeptorblocker Atropin die Aktivität der Acetylcholinesterase bei niedrigen Substratkonzentrationen hemmt, bei hohen AcetylcholinKonzentrationen jedoch eine Steigerung durch die teilweise Aufhebung der Substrathemmung bewirkt (77).

Methylierte Histamine: HMT aus verschiedenen Geweben wie Schweineantrummucoosa (s. Abb. 13), Meerschweinchenhirn (25) und Schweineleber (60) wurden durch 1(ζ)-Methylhistamin in 0,1 mM Konzentration in gleichem Maße gehemmt. Auch die Konzentrations-Hemmkurven für 1(ζ)-Methylhistamin und die drei Enzyme zeigten genau den gleichen Verlauf. Diese sehr gute Übereinstimmung sollte als weiteres Argument für die Ähnlichkeit der HMT aus diesen drei Geweben betrachtet werden.

Die Wirkung der verschiedenen methylierten Histamine auf die HMT zeigte eine besondere Struktur-Wirkungs-Beziehung: 1(ζ)-Methyl-, 2-Methyl- und 3(π)-Methylhistamin, alle also am Imidazolkern methyliert, waren nicht nur relativ starke Inhibitoren, sondern bewirkten auch keine Aktivierung des Enzyms. 5-Methylhistamin, das die Methylgruppe an dem der Aminoäthylseitenkette benachbarten Kohlenstoffatom trägt, und die am Stickstoff der Aminoäthylseitenkette methylierten Histamine waren schwächere Inhibitoren, zeigten aber in niedrigerer Konzentration eine Aktivierung des Enzyms. Es scheint sehr interessant, daß die gleiche Struktur-Wirkungs-Beziehung für die Eigenschaften der verschiedenen methylierten Histamine

an H_1 - und H_2 -Rezeptoren gefunden wurden (5). Die Wirkung von Histamin auf die Histamin-Rezeptoren kann nur durch spezifische Antagonisten differenziert werden: H_1 -Rezeptoren werden durch die klassischen Antihistaminika wie Mepyramin geblockt, H_2 -Rezeptoren nur durch die erst kürzlich synthetisierten Stoffe Burimamid und Metiamid (18, 19). 1($\mathcal{I}$)-Methylhistamin, 2-Methylhistamin und 3(π)-Methylhistamin hatten keine histaminähnlichen Wirkungen am Meerschweinchenvorhof oder an der Magenschleimhaut, beides typische H_2 -Rezeptoren enthaltende Organe, während 5-Methyl-, N' -Methyl- und N',N' -Dimethylhistamin 50 bis 75% der Wirkung des Histamins an diesen Rezeptoren hatten (18).

Die Beobachtung, daß N' -Methylhistamin und N',N' -Dimethylhistamin die Magensaftsekretion stimulieren (86, 34), daß beide die HMT aus Magenschleimhaut hemmen und aktivieren, und daß beide in relativ hohen Konzentrationen im Magensaft und der Magenschleimhaut des Hundes nachgewiesen werden konnten (116), rechtfertigen die Annahme, daß diese Substanzen bei der Magensaftsekretion eine regulierende Funktion entweder durch direkte Wirkung auf die säureproduzierenden Parietalzellen oder über die HMT haben könnten. Lin et al. (86) und Code et al. (34) forderten, daß diese Substanzen direkt auf die sezernierenden Zellen wirkten. Auf Grund der starken Hemmung durch 1($\mathcal{I}$)-Methylhistamin und des stark steigernden Effekts von N',N' -Dimethylhistamin auf die Magen-HMT kann jedoch auch angenommen werden, daß diese beiden methylierten Histamine die Menge physiologisch aktiven Histamins durch Regulation der HMT-Aktivität, das bis jetzt das einzige Histamin inaktivierende Enzym in der Magenschleimhaut höherer Säugetiere ist, kontrollieren. Der Vorschlag, daß zwei natürlich vorkommende Substratanaloge des Histamins die enzymatische Aktivität der HMT regulieren könnten, erscheint als neuer Gesichtspunkt im Metabolismus biogener Amine und könnte einige Effekte von Histamin erklären, die auf der Basis der wirkstoff-Rezeptor-Beziehungen bis jetzt nur schlecht verstanden werden konnten (14). Diese Vorstellungen sollen im folgenden in einem

neuen Modell für das "stimulus-secretion-coupling" an der Belegzelle bei der Magensaftsekretion zusammengefaßt werden.

4.7. Modell für das "stimulus-secretion-coupling" an der Belegzelle des Magens und für die Rolle von methylierten Histaminen und HMT in diesem System (Abb. 31)

Die Säuresekretion aus den Belegzellen des Magens wird im wesentlichen durch drei Substanzgruppen stimuliert:

1. Acetylcholin aus den Nervenendigungen der autonomen Nervengeflechte und aus denen des Nervus vagus,
2. Histamin und seitenkettenmethylierte Histamine und
3. durch die verschiedenen (ca. 16) Gastrine, die Polypeptide verschiedener Kettenlänge mit C-terminalem Tetrapeptid Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ darstellen.

Über den Mechanismus dieser Stimulierung gibt es verschiedene Hypothesen, die seit ca. 50 Jahren heftig diskutiert werden und die nach neueren und neuesten Befunden (s. 1.1.) alle ein bestimmtes Maß an Wahrscheinlichkeit beanspruchen dürfen. Es wurde deshalb versucht, eine Synthese dieser Vorstellungen in einem Modell zu erstellen, das in Abb. 31 dargestellt ist:

1. Die Belegzelle enthält drei Arten von Rezeptoren, die sich gegenseitig in ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem spezifischen Stimulus beeinflussen. Histamin am Histamin-H₂-Rezeptor würde z.B. den Gastrinrezeptor und Acetylcholinrezeptor so sensibilisieren, daß dieselbe Konzentration von Gastrin oder Acetylcholin an diesen Rezeptoren eine erheblich stärkere Reaktion an der Belegzelle auslöst als ohne die Anwesenheit von Histamin am H₂-Rezeptor. (Veränderung der Schwellen, "Potenzierung", s. (58)).
2. Acetylcholin und Gastrin liberieren Histamin aus seinen Speichern im Gewebe, den Mastzellen. Das freigesetzte Histamin stimuliert direkt die Belegzelle über den H₂-Rezeptor (finaler Chemostimulator (32, 93)). Eine Modifizierung dieser Hypothese stellt die von Black et al. (18, 20) dar,

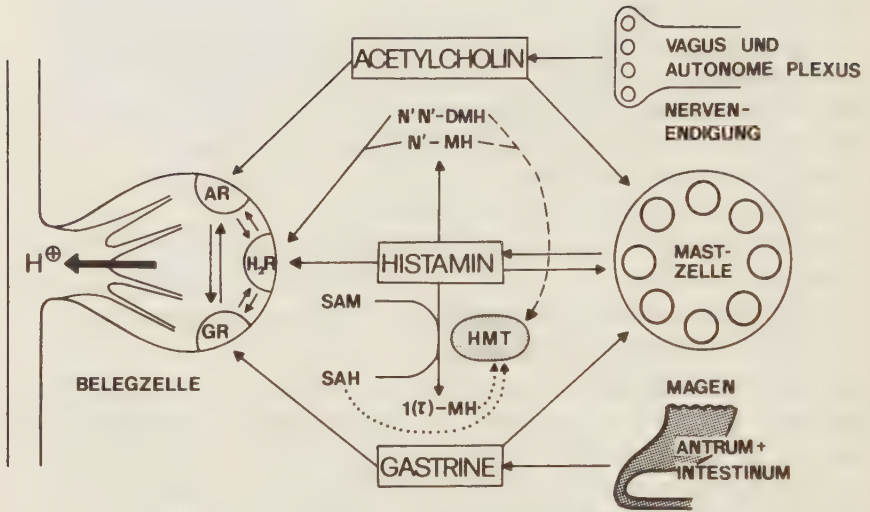


Abb. 31 Modell für das "stimulus-secretion-coupling" an der Belegzelle des Magens und für die Rolle von methylierten Histaminen und HMT in diesem System

(.....→) Hemmung der HMT; (-----→) Aktivierung der HMT.
 AR = Acetylcholinrezeptor; H_2R = Histamin- H_2 -Rezeptor;
 GR = Gastrinrezeptor; $1(\tau)MH_2 = 1(\tau)$ -Methylhistamin;
 N' -MH = N'-Methylhistamin; N',N' -DMH = N',N'-Dimethylhistamin.

daß Acetylcholin direkt auf die Belegzelle wirkt, während Gastrin nur über Histaminfreisetzung die Sekretion des Magens stimuliert.

3. Methylierte Histamine (N' -Methylhistamin, N',N' -Dimethylhistamin, 5-Methylhistamin) stimulieren wie Histamin selbst die Belegzelle am H_2 -Rezeptor (34, 86) oder regulieren

durch Aktivierung der HMT die Konzentration des freien Histamins an der Belegzelle, wobei ihre Gegenspieler das SAH und 1($\bar{L}$)-Methylhistamin sein könnten (diese Arbeit). Außerdem kann freigesetztes Histamin durch Wiederaufnahme in die Speicher inaktiviert werden.

4. Die molekularbiologischen Prozesse, die mit zyklischen AMP und Calcium als "second messenger" innerhalb der Belegzelle ablaufen, werden durch diese Modellvorstellung für die Reaktionen an der Außenseite der Zellen nicht in ihrer Gültigkeit beeinflusst (50).

5. Zusammenfassung

1. Zur Bestimmung der Aktivität der HMT im Gewebe wurden zwei Methoden angewandt. Bei der ersten überarbeiteten Methode wurde die Bildung von ^{14}C -1(τ)-Methylhistamin aus Histamin und ^{14}C -SAM verfolgt, während bei der zweiten neu entwickelten Methode die Abnahme des Substrates Histamin fluorometrisch gemessen wurde. Die Methoden wurden hinsichtlich der Reaktionskinetik, Identifizierung der Reaktionsprodukte bzw. Substrate, optimaler Reaktionsbedingungen und auf Präzision und Richtigkeit geprüft und miteinander verglichen.
2. Erstmals wurde das Vorkommen und die Verteilung der HMT in der Magenschleimhaut von Mensch, Hund und Schwein untersucht und eine Beziehung zwischen der Höhe der Enzymaktivität und der Konzentration des Substrates Histamin in diesen Geweben hergestellt. Verglichen mit anderen Organen enthält der Magen bei allen Spezies die höchsten HMT-Aktivitäten.
3. Aus der Magenantrumschleimhaut des Schweines, die von allen bisher untersuchten Geweben die höchste spezifische Aktivität aufweist, wurde das Enzym durch Ultrazentrifugation, Ammoniumsulfatfraktionierung, Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose und Sephadex G 100 Gelfiltration ca. 120fach angereichert. Damit wurde eine Enzympräparation mit der bisher höchsten spezifischen Aktivität überhaupt erhalten. Weiterhin wurde ein einfaches Routineverfahren zur Gewinnung eines ca. 30fach angereicherten Enzympräparates, das sich in K_m -Werten und pH-Optimum nicht von dem 120fach angereicherten Präparat unterscheidet, entwickelt und zu größeren Inkubationsserien eingesetzt.
4. An Enzymeigenschaften wurden die Haltbarkeit des Enzyms auf verschiedenen Reinigungsstufen, K_m -Werte ($1,71 \times 10^{-5}\text{M}$ für Histamin und $0,87 \times 10^{-5}\text{M}$ für SAM) und pH-Optimum (7,4) untersucht, ebenso die Donor- und Akzeptorsubstratspezifität. Dabei wurde nach Histamin N'-Methylhistamin

als erstes weiteres Akzeptorsubstrat der HMT nachgewiesen. K_m -Wert ($6,6 \times 10^{-5}M$) und pH-Optimum (8,3) unterschieden sich deutlich von den Bedingungen für die optimale Methylierung des Histamins. Außer SAM konnte kein weiteres Donorsubstrat gefunden werden.

5. Auf Grund der Änderung der Anfangsgeschwindigkeiten der Histaminmethylierung mit verschiedenen Histaminkonzentrationen in Abhängigkeit von der Konzentration des SAM und der sich daraus ergebenden Ableitungen, sowie auf Grund von Produktinhibierungsversuchen wurde der Reaktionsmechanismus der Methylierung des Histamins unter Verbrauch von SAM erstmals als "ordered" Sequentialmechanismus beschrieben.
6. An Hemmstoffen wurden solche untersucht, die zur Charakterisierung des aktiven Zentrums des Enzyms (SH-Gruppen-Reagenzien, SH-Gruppen-Protektoren, Metallionen, SAH-Analoga), zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus (Substrate und Substratanaloga, Produkte und Produktanaloga), und zur Klärung der Frage, welche physiologische Bedeutung der HMT sowie deren Substrat Histamin zukommen könnte (methylierte Histamine, H_1 - und H_2 -Rezeptorantagonisten, Antimalariamittel), beitragen können.
7. Es wurde ein Modell für den "stimulus-secretion-coupling"-Mechanismus an der Belegzelle entwickelt, das die drei bisher bekannten Hormone bzw. Überträgersubstanzen umfaßt. Die HMT reguliert dabei die freie, am Histamin- H_2 -Rezeptor verfügbare Menge an Histamin. Methylierte Histamine erhöhen (N'-Methylhistamin, N',N'-Dimethylhistamin) oder vermindern (1(Z)-Methylhistamin) dabei die Aktivität des Enzyms.

6. Literaturverzeichnis

1. Albert A. & Brown D.J. (1954) J. Chem. Soc., 2060-2071
2. Alberty R.A. (1956) Advances in Enzymology 17, 1-64
3. Amure B.O. & Ginsburg M. (1964) Brit. J. Pharmacol. 22, 520-526
4. Amure B.O. & Ginsburg M. (1964) Brit. J. Pharmacol. 23, 476-485
5. Ash A.S.F. & Schild H.O. (1966) Brit. J. Pharmacol. Chemother. 27, 427-439
6. Ashe H., Clark B.R., Chu F., Harely D.N., Halpern B.C., Halpern R.M. & Smith R.A. (1974) Biochem. Biophys. Res. Comm. 57, 417-425
7. Aures D., Davidson W.B. & Håkanson R. (1969) Eur. J. Pharmacol. 8, 100-107
8. Axelrod J. & Tomchick R. (1958) J. Biol. Chem. 233, 702-705
9. Axelrod J. & Vesell E.S. (1970) Mol. Pharmacol. 6, 78-84
10. Aziz A.A. (1961) Biochem. J. 80, 50P-50P
11. Baddiley J., Cantoni G.L. & Janison G.A. (1953) J. Chem. Soc. 1953, 2662-2664
12. Ball P., Knuppen R., Haupt M. & Breuer H. (1972) Eur. J. Biochem. 26, 560-569
13. Barnajee S.P. & Snyder S.H. (1973) Science N.Y. 182, 74-75
14. Barth H., Lorenz W. & Troidl H. (1975) Brit. J. Pharmacol. (im Druck)
15. Baudry M., Chast F. & Schwartz J.-C. (1973) J. Neurochem. 20, 13-21
16. Bergmeyer H.U. (1970) in "Methoden der enzymatischen Analyse", Bd I, Verlag Chemie, Weinheim, 346-347
17. Best C.H. & McHenry E.W. (1930) J. Physiol. 70, 349-372
18. Black J.W., Duncan W.A.M., Durant C.J., Ganellin C.R. & Parsons E.M. (1972) Nature 236, 385-390
19. Black J.W., Duncan W.A.M., Emmet J.C., Ganellin C.R., Hesselbo T., Parsons M.E. & Wyllie J.H. (1973) Agents Actions 3, 133-137
20. Black J.W. (1973) in: "International Symposium on Histamine H₂-Receptor Antagonists" (Herausgeber C.J. Wood u. M.A. Simkins), Deltakos Ltd., London, 219-221
21. Black J.W. & Ganellin C.R. (1974) Experientia 30, 111-113
22. Black J.W., Durant G.I., Emmet J.C. & Ganellin C.R. (1974) Nature 248, 65-67
23. Borchardt R.T. & Wu Y.S. (1974) J. Med. Chem. 17, 862-868
24. Borchardt R.T., Huber J.A. & Wu Y.S. (1974) J. Med. Chem. 17, 868-873
25. Brown D.D., Tomchick R. & Axelrod J. (1959) J. Biol. Chem. 234, 2948-2950

26. Brown D.D., Axelrod J. & Tomchick R. (1959) *Nature* 183, 680-680
27. Cleland W.W. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67, 104-137
28. Cleland W.W. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67, 173-187
29. Cleland W.W. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67, 188-196
30. Cleland W.W. (1964) *Biochemistry* 3, 480-482
31. Cleland W.W. (1970) in: "The Enzymes", Bd II, 3. Ausgabe (Herausgeber Boyer P.D.) Academic Press, London, 1-65
32. Code C.F. (1956) in: "Ciba Foundation Symposium on Histamine" (Herausgeber G.E.W. Wolstenholme & C.M. O'Connor) J. & A. Churchill, London, 189-219
33. Code C.F. (1965) *Fed. Proc.* 24, 1311-1321
34. Code C.F., Maśliński S.M., Messini F. & Navert H. (1971) *J. Physiol.* 217, 557-571
35. Cohn V.H. (1965) *Biochem. Pharmacol.* 14, 1686-1688
36. Cohn V.H. (1966) *Fed. Proc.* 23, 691-691
37. Cohn V.H. & Wynn W. (1968) *Fed. Proc.* 27, 243-243
38. Connet R.J. & Kirshner N. (1970) *J. biol. Chem.* 245, 329-334
39. Cooke A.R. (1970) *Gastroenterology* 58, 633-637
40. Coward J.K. & Sweet W.D. (1972) *J. Med. Chem.* 15, 381-384
41. Coward J.K., d'Urso Scott M. & Sweet W.D. (1972) *Biochem. Pharmac.* 21, 1200-1203
42. Coward J.K. & Slisz E.P. (1973) *J. Med. Chem.* 16, 460-463
43. Coward J.K., Slisz E.P. & Wu F.Y.-H. (1973) *Biochemistry* 12, 2291-2297
44. Dalziel K. (1957) *Acta Chem. Scand.* 11, 1706-1723
45. Dalziel K. (1969) *Biochem. J.* 114, 547-556
46. Deguchi T. & Barchas J. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 3175-3181
47. Dervartanian D.V., Zeylemaker W.P. & Veeger C. (1966) in: "Flavins and Flavoproteins" (Herausgeber E.C. Slater), Elsevier, Amsterdam, 183-209
48. Dinbar A. & Grossmann M.I. (1972) *Gastroenterology* 62, 242-246
49. Dombro R., Huang M., Dittbrenner M. & Rapins H. (1969) *Amer. J. Physiol.* 216, 988-994
50. Dousa T.P. & Code C.F. (1973) in: "International Symposium on Histamine H₂-Receptor Antagonists" (Herausgeber C.J. Wood & M.A. Simkins), Deltakos Ltd., London, 319-330
51. DuVigneaud V., Rachele J.R. & White A.M. (1956) *J. Amer. chem. Soc.* 78, 5131-5132
52. Dworetzky M. & Code C.F. (1951) *Amer. J. Physiol.* 166, 462-469
53. Fielding L.P., Curwain B.P., Russell R.C.G. & Bloom S. (1974) *Brit. J. Surg.* (im Druck)

54. Flohé L. & Schwabe K.P. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 220, 469-476
55. Flohé L. & Schwabe K.P. (1972) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 463-475
56. Gregory R.A. (1958) *J. Physiol.* 144, 123-137
57. Grossman M.I. (1967) in: "Handbook of Physiology" Bd VI (Herausgeber C.F. Code), Williams & Wilkins, Baltimore, 835-863
58. Grossman M.I. & Konturek S.J. (1973) in: "International Symposium on Histamine H₂-Receptor Antagonists" (Herausgeber C.J. Wood und M.A. Simkins), Deltakos Ltd. London, 297-312
59. Gustafsson A. & Forshell G.P. (1963) *Acta Chem. Scand.* 17, 541-542
60. Gustafsson A. & Forshell G.P. (1964) *Acta Chem. Scand.* 18, 2069-2076
61. Haeger K. & Kahlson G. (1952) *Acta Physiol. Scand.* 25, 230-242
62. Håkanson R., Lilja B. & Owman Ch. (1969) *Histochemie* 18, 74-86
63. Håkanson R. (1970) *Acta Physiol. Scand.*, Suppl. 340, 1-134
64. Håkanson R. & Lindberg G. (1971) *Amer. J. Physiol.* 221, 641-643
65. Harris G.W., Jacobsohn D. & Kahlson G. (1952) *Ciba Found. Coll. on Endocr.* 4, 186-194
66. Henson C.P. & Cleland W.W. (1964) *Biochemistry* 3, 338-345
67. Hildesheim J., Hildesheim R. & Lederer E. (1971) *Biochimie* 53, 1067-1071
68. Hildesheim J., Hildesheim R. & Lederer E. (1972) *Biochimie* 54, 431-437
69. Hildesheim J., Hildesheim R., Lederer E. & You J. (1972) *Biochimie* 54, 989-995
70. Hildesheim J., Hildesheim R., Blanchard P., Farrugia G. & Michelot R. (1973) *Biochimie* 55, 541-546
71. Hofstee B.H.J. (1952) *Science* 116, 329-331
72. Hsu L.L. & Mandell A.J. (1973) *Life Sci.* 13, 847-858
73. Johnson L.R. & Grossman M.I. (1969) *Gastroenterology* 56, 687-692
74. Johnson L.R. (1971) *Gastroenterology* 61, 106-118
75. Ivy A.C. & Bachrach W.H. (1966) in: "Histamine and Anti-histaminics" (Herausgeber A. Farah u. O. Eichler), Springer Berlin-Heidelberg-New York, 810-891
76. Kapeller-Adler R. & Iggo B. (1957) *Biochim. Biophys. Acta* 25, 394-402
77. Kato G., Tau E. & Yung J. (1972) *Nature New Biology* 236, 185-185

78. Kim K.S., Backus B., Harris M. & Rourke P. (1969), *Comp. Biochem. Physiol.* 31, 137-145
79. Kobayashi Y. & Ivy A.C. (1958) *Amer. J. Physiol.* 135, 525-527
80. Kobayashi Y. & Ivy A.C. (1959) *Amer. J. Physiol.* 196, 835-836
81. Kobayashi Y. & Maudsley D.V. (1972) *Anal. Biochem.* 46, 85-90
82. Konturek S.J. & Olesky J. (1967) *Gastroenterology* 53, 912-917
83. Kusche J., Lorenz W., Hahn H. & Werle E. (1969) *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol.* 264, 265-266
84. Laduron P.M., Gommeren W.K. & Leysen J.E. (1974) *Biochem. Pharmacol.* 23, 1599-1608
85. Lin R.-L., Narasimhachari N. & Himwich H.E. (1973), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 54, 751-759
86. Lin T.M., Alphin R.S., Henderson F.G., Bensley D.N. & Chen K.K. (1962), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 99, 30-44
87. Lindahl K.M. (1960) *Acta Physiol. Scand.* 49, 114-138
88. Lindahl-Kiessling K.M. (1962) *Acta Chem. Scand.* 16, 2293-2294
89. Lindberg S. (1963) *Acta Obstet. Gyn. Scand.* 42, Suppl. 1, 49-58
90. Lineweaver H. & Burk D. (1934) *J. Amer. Chem. Soc.* 56, 658-666
91. Lorenz W., Kusche J. & Werle E. (1967) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348, 561-567
92. Lorenz W., Kusche J., Hahn H. & Werle E. (1968) *Z. Anal. Chem.* 243, 259-263
93. Lorenz W. & Pfleger K. (1968) *Klin. Wschr.* 46, 57-71
94. Lorenz W., Halbach S., Feifel G., Haendle H. & Werle E. (1969), *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol.* 264, 273-273
95. Lorenz W., Halbach S., Gerant M. & Werle E. (1969), *Biochem. Pharmacol.* 18, 2625-2637
96. Lorenz W., Schauer A., Heitland St., Matejka E. & Werle E. (1969) *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol.* 264, 274-274
97. Lorenz W., Schauer A., Heitland St., Calvoer R. & Werle E. (1969) *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol.* 265, 81-100
98. Lorenz W., Benesch L., Barth H., Matejka E., Meyer R., Kusche J., Hutzl M. & Werle E. (1970) *Z. Anal. Chem.* 252, 94-98
99. Lorenz W., Doenicke A., Feifel G., Messmer K., Meier R., Benesch L., Barth H., Kusche J., Hutzl M. & Werle E. (1970) *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol.* 266, 396-396
100. Lorenz W., Barth H. & Werle E. (1970) *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol.* 267, 421-432

101. Lorenz W., Barth H., Kusche J., Reimann H.-J., Schmal A., Matejka E., Mathias Ch., Hutzl M. & Werle E. (1971) Eur. J. Pharmacol. 14, 155-175
102. Lorenz W., Reimann H.-J., Barth H., Kusche J., Meyer R., Doenicke A. & Hutzl M. (1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 911-920
103. Lorenz W., Schmal A., Reimann H.-J., Tauber R., Uhlig R., Mann G., Barth H., Kusche J., Seidel W., Doenicke A., Hamelmann H. & Werle E. (1972) J. Pharmacol. (Paris) 3, 526-526
104. Lorenz W., Matejka G., Schmal A., Seidel W., Reimann H.-J., Uhlig R. & Mann G. (1973) Comp. Gen. Pharmac. 4, 229-250
105. Lorenz W., Barth H., Schmal A., Niemeyer I. & Dormann P. (1974), Agents Actions 4, 206-208
106. Lorenz W., Barth H., Thermann M., Schmal A., Dormann P. & Niemeyer I. (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1097-1111
107. Lorenz W., Barth H., Karges E., Schmal A., Dormann P. & Niemeyer I. (1974) Agents Actions 4 (im Druck)
108. Lorenz W., Thermann M., Messmer K., Schmal A., Dormann P., Kusche J., Barth H., Tauber R., Hutzl M., Mann G. & Uhlig R. (1974) Agents Actions 4 (im Druck)
109. Lorenz W., Barth H., Kusche J., Troidl H., Rohde H., Schmal A., Stenner W., Nusimé H., Häfner G., Glass R. & Friedrich A. (1975) in: "International Symposium on Gastrointestinal Hormones" (Herausgeber S. Konturek) Raven Press, New York (im Druck)
110. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
111. Mahler H.R. & Cordes E.H. (1967) in: "Basic Biological Chemistry", Harper and Row, N.Y., 150-173
112. Makhlof G.M., MacManus J.P.A. & Knill J.R. (1968) Gastroenterology 54, 532-537
113. Merrill C.R., Snyder S.H. & Bradley D.F. (1966) Biochim. Biophys. Acta 118, 316-324
114. Moroni F., Fantozzi R. & Mannaioni P.F. (1973) Agents Actions 3, 187-189
115. Mudd S.H. & Cantoni G.L. (1964) Comprehensive Biochemistry 15, 1-47
116. Navert H., Flock E.V., Tyce G.M. & Code C.F. (1969) Physiologist 12, 313-313
117. Netter K.J. & Bodenschatz K. (1967) Biochem. Pharmacol. 16, 1627-1631
118. O'Leary W.M. (1965) in: "Transmethylation and Methionine Biosynthesis" (Herausgeber Shapiro S.K. & Schlenk F.) Chicago Press, Chicago-London, 94-106
119. Pendleton R.G. & Snow I.B. (1973) Mol. Pharmacol. 2, 718-725

120. Plowman K. (1972) in: "Enzyme Kinetics", New York, McGraw-Hill Book Co., Kapitel 4
121. Popielski L. (1920) Pflügers' Arch. Ges. Physiol. 178, 214-259
122. Reilly M.A. & Schayer R.W. (1970) Brit. J. Pharmacol. 38, 478-489
123. Reilly M.A. & Schayer R.W. (1971) Brit. J. Pharmacol. 42, 375-382
124. Reilly M.A. & Schayer R.W. (1971) Brit. J. Pharmacol. 43, 349-358
125. Rose B., Karady S. & Browne J.S.L. (1940) Amer. J. Physiol. 129, 219-225
126. Schayer R.W. (1959) Physiol. Rev. 33, 116-126
127. Schayer R.W. & Reilly M.A. (1970) J. Neurochem. 17, 1649-1655
128. Schayer R.W. & Reilly M.A. (1973) J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 34-39
129. Schayer R.W. & Reilly M.A. (1974) Eur. J. Pharmacol. 25, 101-107
130. Schlenk F. (1965) in: "Fortschritte der Chemie org. Naturstoffe", Bd 23 (Herausgeber L. Zechmeister), Springer Verlag, Wien, 61-112
131. Schwartz J.-C., Pollard H., Bischoff S., Rahault M.C. & Verdierre-Sahuque M. (1971) Eur. J. Pharmacol. 16, 326-335
132. Schwartz J.-C., Rose C. & Caillens H. (1973) J. Pharmacol. Exp. Ther. 184, 766-779
133. Shapiro S.K. & Schlenk F. (1960) Advances in Enzymology 22, 237-280
134. Shore P.A., Burkhalter A. & Cohn V.H. Jr. (1959) J. Pharmacol. Exp. Ther. 127, 182-186
135. Sketol J.A. (1963) Methods in Enzymology 6, 566-577
136. Snedecor G.W. & Cochran W.G. (1967) in: "Statistical Methods . The Iowa State University Press, Ames, Iowa
137. Snyder S.H. & Axelrod J. (1965) Biochim. Biophys. Acta 111, 416-421
138. Snyder S.H., Baldessarini R.J. & Axelrod J. (1966) J. Pharmacol. Exp. Ther. 153, 544-549
139. Suriyachan D. & Thithapandha A. (1972) Biochem. Biophys. Res. Comm. 48, 1199-1207
140. Taylor K.M. & Snyder S.H. (1972) Mol. Pharmacol. 8, 300-310
141. Taylor K.M. & Snyder S.H. (1972) J. Neurochem. 19, 1343-1358
142. Taylor K.M. (1973) Biochem. Pharmacol. 22, 2775-2776
143. Thithapandha A. & Cohn V.H. (1970) Fed. Proc. 29, 684-684
144. Thithapandha A. (1971) Diss. Abstr. B, 31, 6796-6797
145. Thithapandha A. (1972) Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 301-308

146. Thithapandha A., Srinoot P. (1972) *Comp. Gen. Pharmacol.* 3, 139-144
147. Thunberg R. (1967) *Exp. Cell. Res.* 47, 103-115
148. Troidl H., Lorenz W., Barth H., Rohde H., Feifel G., Schmal A., Goecke K., Reimann-Huhnd A. & Seidel W. (1973) *Agents Actions* 3, 157-167
149. Uhr M.L., Marcus F. & Morrison J.F. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 5428-5435
150. Vance J.W. & Bragg S.C. (1969) *Diabetes* 18, Suppl. 1, 326-327
151. Warburg D. & Christian W. (1936) *Biochem. Z.* 287, 291-328
152. Waton N.G. (1956) *Brit. J. Pharmacol.* 11, 119-127
153. Waton N.G. (1971) *Amer. J. Digest. Dis.* 16, 921-938
154. Webb J.L. (1966) in: "Enzyme and Metabolic Inhibitors" Bd II, Academic Press, New York-London
155. Webb J.L. (1966) in: "Enzyme and Metabolic Inhibitors" Bd III, Academic Press, New York-London
156. Weichselbaum T.E. (1946) *Amer. J. Clin. Pathol.* 10, 40-46
157. Werle E. (1940) *Biochem. Z.* 304, 201-213
158. White T. (1961) *J. Physiol.* 159, 191-197
159. White T. (1966) *Brit. J. Pharmacol.* 26, 494-501
160. Zapria V., Zydeck-Cwick C.R. & Schlenk F. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4499-4509

Lebenslauf
von Hans Barth

12.5.1944	geboren in Greifenberg/Ammersee, Oberbayern Eltern: Hans Barth und Emma Barth, geb. Weber
1950-1954	Volksschule in Greifenberg/Ammersee
1954-1963	Neusprachliches Realgymnasium "Stiftung Landerziehungsheim Schondorf/ Ammersee"
Juni 1963	Abitur
1963-1968	Studium der Chemie an der Universität München
Oktober 1966	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
Dezember 1968	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
seit November 1969	Studium der Medizin an der Universität München
Januar 1970	Fertigstellung der Diplomarbeit am Institut für Klinische Chemie und Klinische Bio- chemie der Universität München
ab Februar 1970	Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Klinische Chemie und Klinische Bio- chemie der Universität München
Februar 1970 - März 1971	Wissenschaftlicher Angestellter beim SFB 37 "Substitution und Restitution innerer Organe" an der Universität München
April 1970	Naturwissenschaftliche Vorprüfung im Fach Medizin
April 1971	Ärztliche Vorprüfung
seit April 1971	Fortsetzung des Medizinstudiums an der Universität Marburg/Lahn
seit April 1971	Wissenschaftlicher Angestellter an der Abteilung für Experimentelle Chirurgie und Pathologische Biochemie an der Chirurgischen Klinik der Universität Marburg/Lahn
am 12.6.1970	heiratete ich meine Frau Irmgard Barth, geb. Riedl Wir haben zwei Töchter, Jonna, geb. 7.2.1973, und Xenia, geb. 4.2.1975

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren

Amberger, Fischer, Nöth, Weiss und Wiberg	für anorganische Chemie
--	-------------------------

Gompper, Huisgen, Rüchardt und Sauer	für organische Chemie
---	-----------------------

Dickel, Schwab und Zimmermann	für physikalische Chemie
-------------------------------	--------------------------

Faessler und Rollwagen	für Physik
------------------------	------------

Lynen	für Biochemie
-------	---------------

Werle	für klinische Chemie und klinische Biochemie
-------	---

